

Tesis de Posgrado

Fotoquímica de β -Carbolinas en soluciones orgánicas diluidas

Biondic, Miriana Carla

1996

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias
Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Biondic, Miriana Carla. (1996). Fotoquímica de β -Carbolinas en soluciones orgánicas diluidas. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2831_Biondic.pdf

Cita tipo Chicago:

Biondic, Miriana Carla. "Fotoquímica de β -Carbolinas en soluciones orgánicas diluidas". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1996.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2831_Biondic.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

**FOTOQUÍMICA DE β -CARBOLINAS EN SOLUCIONES
ORGÁNICAS DILUIDAS**

Miriana Carla Biondic

Lugar de Trabajo: **Departamento de Química Orgánica**

Directora de Tesis: **Dra. Rosa Erra-Balsells**

Tesis presentada para optar al título de
Doctor de la Universidad de Buenos Aires

1996

a Davor, mi esposo

quien siempre alentó este proyecto

Mi más sincero agradecimiento

a la Dra Rosa Erra Balsells,

quien dirigió este trabajo, brindándome todos sus
conocimientos, su ejemplo de dedicación al trabajo y
mucho paciencia.

Agradezco a todos los que de una manera u otra hicieron posible la concreción de este trabajo de Tesis, a saber:

A Davor y Luka

A mis padres

A la gente del grupo de Fotoquímica Orgánica:

Sergio Bonesi, por su constante buen humor y gran paciencia,

Daniel Murgida, por sus estimulantes discusiones

Alberto Postigo (aun desde Canadá)

y a los más jóvenes: Sara Luluaga, Carla Serebrinski, Juan Vuolo, Hernán Tissera, Fanny Console y especialmente a Olga Tarzi por su colaboración.

A Patricia A. Zunszain, por su amistad

A los ex-"chicos del otro lado del Laboratorio", por orden de aparición: Pimpi Salinas Daniel Cicero, Alejandro P. Nin, Patricia A. Zunszain, Cristián Di Nardo y Hernán Orgueira, porque la convivencia fue muy agradable y muchas veces divertida.

A mis queridos vecinos de Laboratorio (algunos ya en otros lados): Alicia Baldessari, María Alejandra Ponce, Gustavo Revelli, Darío Doller, Gerardo Caballero, Juan Bautista Rodríguez, Osvaldo Teme Centurión, Luis Iglesias, Walter Samaniego, Lydia Galagovsky, Andrea Judith Schvartzapel, Andrea Bruttomesso; y si bien geográficamente más alejados, Henry Hughes y Sergio Giacopello, por todos los momentos compartidos.

Al Dr. Eduardo G. Gros, quien compró e importó algunas de las β -carbolidinas, materia prima de este trabajo.

A los demás miembros del Departamento de Química Orgánica tanto profesores como docentes auxiliares y tesistas que contribuyeron a mi formación.

A Mabel Tudino, Liliana D'Huicque, Jorge Stripeiskis, Pancho y al Dr. Osvaldo Tróccoli del Laboratorio de Análisis de Trazas, por las innumerables veces que nos dieron una mano salvadora con material, drogas y computadoras.

Al Dr. Claudio Colombano, por su asesoramiento en luminiscencia e interesantes charlas.

A Luis Baraldo y Leonardo Slep, al Dr. José Olabe y al resto del grupo: Vicente, Paula, Alejandro, Fabio, quienes me ayudaron con muchas ideas, mediciones, problemas de PC, dedicando desinteresadamente su tiempo.

A Eduardo Lopez, María del Carmen Ares y las chicas del INQUIMAE: Alicia, Andrea e Irene, por su siempre gentil disposición.

Al Dr. Eduardo Lissi, Dra. María Victoria Encinas, Dra. Elsa Abuin y todo el grupo de Cinética Química del Departamento de Química de la Universidad de Santiago de Chile, quienes hicieron que mi estadía fuera muy fructífera y a Gabriela y Marcelo porque fueron excelentes anfitriones.

al CONICET, por la Beca Doctoral.

a la Universidad de Buenos Aires, por la Beca de Estudiante.

a la Comisión Quinto Centenario, España, por el apoyo económico.

a UMYMFOR (CONICET-FCEyN) por el equipo técnico suministrado y especialmente por la realización de los espectros correspondientes al Sr. Jorge A. Azanárez (espectros de masa), a los Dres. G. Caballero, D. Doller y J.B. Rodríguez (espectros RMN), a las Lic. M. Rivero y M. Moglia (cromatografías gaseosas) y a la Lic. M. Marcote (análisis elemental).

A la Dra. Alicia Seldes, por el uso del cromatógrafo gaseoso.

A la Lic. Raquel Gettar de la CNEA, con quien realicé las experiencias de cromatografía iónica y al Lic. R. Crubellati por facilitarnos el uso del equipo.

Al Dr. Gerardo D. Castro, quien me permitió realizar las experiencias en el CEITOX (CITEFA-CONICET) poniendo a disposición toda su experiencia y equipamiento.

Al Dr. Carlos Previtali y su equipo de investigadores, en cuyo laboratorio pude medir los tiempos de vida de fluorescencia gracias a su generosidad y amable colaboración.

Al Dr. Gerardo Burton, Dr. Eduardo Gros, Dr. Luis Baraldo, futuro Dr. Leonardo Slep y Dr. H. Nonami por la generosa asistencia con el "soft" de computación y aún más generoso préstamo de "hard".

A los responsables del Perkin Elmer LS-5, al que pudimos acceder sin restricciones.

A la Fundación Herman Pavrlišak, por el apoyo económico recibido.

Al personal de la Biblioteca Central

ÍNDICE GENERAL

<i>Abreviaturas</i>	I
<i>Índice de Figuras</i>	II
<i>Índice de Tablas</i>	III
<i>Índice de Esquemas</i>	III
<i>Índice de Ecuaciones</i>	VI
<i>Publicaciones y premios</i>	V

INTRODUCCIÓN	1
---------------------	---

CAPÍTULO 1: ESPECTROSCOPIA ELECTRÓNICA	5
---	---

<i>Introducción</i>	7
---------------------	---

1.1 B-carbolinas aromáticas

1.1.1 <i>Espectros de absorción UV-vis. en medios líquidos</i>	10
--	----

1.1.2 <i>Espectros de emisión fluorescente en medios líquidos</i>	14
---	----

1.1.3 <i>Espectros de excitación fluorescente en medios líquidos</i>	16
--	----

1.1.4 <i>Espectros electrónicos de excitación y emisión en medios rígidos</i>	
---	--

<i>Matrices de EtOH a 77K</i>	33
-------------------------------	----

<i>Matrices de sílica gel, celulosa y muestra en polvo</i>	40
--	----

1.1.5 <i>Interacción soluto-solvente. Ecuación de Lippert-Mataga</i>	47
--	----

1.1.6 <i>Efecto de solvatación preferencial por los alcoholes en solventes no polares</i>	50
---	----

1.1.7 <i>Efecto de la concentración en los espectros electrónicos</i>	62
---	----

1.1.8 <i>Tiempos de vida de fluorescencia</i>	64
---	----

1.2 B-Carbolinas 3,4-dihidrogenadas

1.2.1 <i>Espectros de absorción UV-vis en medios líquidos</i>	71
---	----

1.2.2 <i>Espectros de emisión fluorescente en medios líquidos</i>	74
---	----

1.2.3 <i>Espectros de excitación fluorescente en medios líquidos</i>	76
--	----

1.2.4 <i>Espectros electrónicos de excitación y emisión en medios rígidos</i>	
---	--

<i>Matrices de EtOH a 77K</i>	89
-------------------------------	----

<i>Matrices de sílica gel, celulosa y muestra en polvo</i>	90
--	----

<i>Conclusiones</i>	100
---------------------	-----

CAPÍTULO 2: EQUILIBRIOS ÁCIDO-BASE EN SOLVENTES ORGÁNICOS

	105
<i>Introducción</i>	107
<i>Propiedades ácido-base de las β-carbolinas en solventes orgánicos</i>	115
<i>Equilibrios prototrópicos en solventes orgánicos</i>	116
2.1 <i>Determinación de pKa en acetonitrilo</i>	119
2.2 <i>Determinación de pKa* en acetonitrilo</i>	124
2.3 <i>Determinación de ΔpK_a</i>	128
2.4 <i>Determinación de pKa por titulación fluorométrica</i>	130
2.5 <i>Efecto de los agentes desecantes usados en los solventes sobre los espectros electrónicos del harmalol y el harmol</i>	135
<i>Conclusiones</i>	145

CAPÍTULO 3: INTERACCIÓN ENTRE β -CARBOLINAS AROMÁTICAS Y COMPUESTOS HALOGENADOS

	147
3.1 <i>Interacción entre β-carbolinas aromáticas y compuestos halogenados en el estado fundamental</i>	149
3.2 <i>Interacción entre β-carbolinas aromáticas en el estado electrónico excitado singulete y compuestos halogenados en el estado fundamental</i>	157
3.3 <i>Cálculos de la variación de energía libre de Gibbs asociada a la transferencia electrónica</i>	165
3.4 <i>Cálculos de la energía de reorganización del solvente λ</i>	181
3.5 <i>Apagamiento de fluorescencia con altas concentraciones de quencher</i>	183
<i>Conclusiones</i>	188

CAPÍTULO 4: REACCIÓN FOTOQUÍMICA DE LAS β -CARBOLINAS AROMÁTICAS

	189
<i>Introducción</i>	191
4.1 <i>Irradiación en escala preparativa de β-carbolinas en solución en presencia de CCl_4</i>	193
4.1.1 <i>Identificación de los productos principales de la reacción</i>	193
4.1.2 <i>Caracterización e identificación de los productos secundarios de la reacción</i>	197
4.1.3 <i>Generación térmica de radicales $\cdot CCl_3$</i>	202
4.1.4 <i>Determinación de las eficiencias cuánticas de formación de cloruros y de protones</i>	203

4.2 Reacción fotoquímica entre las β -carbolinas aromáticas y CHCl_3	206
4.3 Irradiación en escala preparativa de β -carbolinas en presencia de CH_2Cl_2	207
4.4 Aspectos cinéticos	209
4.4.1 Reacción fotoquímica en presencia de CCl_4	209
4.4.2 Reacción fotoquímica en la presencia de atrapanes de radicales	218
4.4.3 Transferencia de electrón o transferencia de energía	222
4.4.4 Influencia del solvente en la reacción fotoquímica en presencia de CCl_4	227
Conclusiones	230
PARTE EXPERIMENTAL	233
E.1 β -carbolinas	235
E.2 Solventes	235
E.3 Equipos utilizados	236
E.4 Espectros electrónicos	237
E.4.1 Determinación de la K de asociación entre β -carbolinas y ROH	238
E.4.2 Determinación de la K_a en MeCN	238
E.5.1 Medición del apagamiento (quenching) de la fluorescencia	239
E.5.2 Medición de los rendimientos cuánticos de fluorescencia Φ_f	239
E.5.3 Medición de los tiempos de vida de emisión fluorescente	240
E.6 Determinación de los potenciales de oxidación de las β -carbolinas aromáticas	241
E.7 Irradiación de β -carbolinas aromáticas	242
E.7.1 Irradiación en escala preparativa en soluciones de ROH con CCl_4	242
E.7.1.1 Identificación de los productos principales	242
E.7.1.2 Caracterización e identificación de subproductos por cg y cg-EM	244
E.7.2 Irradiación en CHCl_3	250
E.7.2.1 Irradiación en presencia de atrapanes de radicales	250
E.7.3 Irradiación en CH_2Cl_2	250
E.8 Síntesis térmica de clorhidratos de β -carbolinas	251
E.9 Síntesis de cloro derivados de β -carbolinas	252
E.10 Generación térmica de radicales $\cdot\text{CCl}_3$	253
E.11 Medición de eficiencias cuánticas de formación de iones cloruros	254

E.12.1	<i>Medición de los rendimientos cuánticos de formación de producto y desaparición de reactivo</i>	256
E.12.2	<i>Medición de las constantes de velocidad k en distintos solventes</i>	259
E.12.3	<i>Medición de las constantes de velocidad k en presencia de atrapantes de radicales</i>	260
E.13	<i>Descripción del Specfit-Factor Analysis FA</i>	261
E.14	<i>Modelado molecular</i>	263
RESUMEN		267
BIBLIOGRAFÍA		275
CARÁTULA EN INGLÉS		285
ABSTRACT		287

Abreviaturas

i-PrOH	2-propanol
n-PrOH	1-propanol
t-BuOH	2-metil-2-propanol
n-BuOH	1-butanol
EtOH	etanol
MeOH	metanol
MeCN	acetonitrilo
N-H	<i>nor</i> -harmano
Ho	harmano
Ha	harmina
Hl	harmol
ha	harmalina
hl	harmalol
<i>A</i>	absorbancia
ϵ	coeficiente de absorción molar
M	molar: mol dm ⁻³
UV	ultravioleta
UV-vis.	ultravioleta-visible
RMN- ¹ H	resonancia magnética nuclear de protón
RMN- ¹³ C	resonancia magnética nuclear de carbono 13
cg	cromatografía gaseosa
EM	espectroscopía de masa
ccd	cromatografía en capa delgada
p.f.	punto de fusión
Rf	relación de frentes
t _r	tiempo de retención

Índice de Figuras

	Página		Página
Figura 1	3	Figura 25	136
Figura 2	4	Figura 26	137
Figura 3	12	Figura 27	139
Figura 4	15	Figura 28	153
Figura 5	17	Figura 29	159
Figura 6A	35	Figura 30	173
Figura 6B	36	Figura 31	174
Figura 7A	42	Figura 32	175
Figura 7B	43	Figura 33	178
Figura 8	44	Figura 34	179
Figura 9	49	Figura 35	180
Figura 10A	52	Figura 36	185
Figura 10B	53	Figura 37	185
Figura 11	57	Figura 38	194
Figura 12	59	Figura 39	195
Figura 13	60	Figura 40	196
Figura 14	62	Figura 41	208
Figura 15	67	Figura 42	211
Figura 16	73	Figura 43	212
Figura 17	75	Figura 44	219
Figura 18A	77	Figura 45	220
Figura 18B	78	Figura 46	221
Figura 18C	79	Figura 47	242
Figura 19A	80		
Figura 19B	81		
Figura 19C	82		
Figura 20A	92		
Figura 20B	93		
Figura 21A	94		
Figura 21B	95		
Figura 22	107		
Figura 23	121		
Figura 24	134		

Índice de Tablas

	Página		Página
Tabla 1	18-21	Tabla 32	184
Tabla 2	22-25	Tabla 33	186
Tabla 3	26-29	Tabla 34	200
Tabla 4	30-32	Tabla 35	204
Tabla 5	37-39	Tabla 36	205
Tabla 6	45-46	Tabla 37	216
Tabla 7	54	Tabla 38	227
Tabla 8a	55	Tabla 39	228
Tabla 8b	56	Tabla 40	263
Tabla 9	61	Tabla 41	265
Tabla 10	66		
Tabla 11	68		
Tabla 12	69		
Tabla 13	84-86		
Tabla 14	87-88		
Tabla 15	96-97		
Tabla 16	98-99		
Tabla 17	102		
Tabla 18	102		
Tabla 19	113		
Tabla 20	118		
Tabla 21	120		
Tabla 22	127		
Tabla 23	129		
Tabla 24	132		
Tabla 25	140-143		
Tabla 26	159		
Tabla 27	160-161		
Tabla 28	166		
Tabla 29	167		
Tabla 30	172		
Tabla 31	182		

Índice de Esquemas

	Página
Esquema 1	125
Esquema 2	162
Esquema 3	169
Esquema 4	213
Esquema 5	222

Índice de Ecuaciones

	Página		Página
Ecuación [1]	48	Ecuación [32]	166
Ecuación [2]	51	Ecuación [33]	170
Ecuación [3]	51	Ecuación [34]	170
Ecuación [4]	54	Ecuación [35]	170
Ecuación [5]	54	Ecuación [36]	170
Ecuación [6]	54	Ecuación [37]	170
Ecuación [7]	60	Ecuación [38]	170
Ecuación [8]	64	Ecuación [39]	171
Ecuación [9]	112	Ecuación [40]	171
Ecuación [10]	116	Ecuación [41]	181
Ecuación [11]	116	Ecuación [42]	181
Ecuación [12]	117	Ecuación [43]	181
Ecuación [13]	119	Ecuación [44]	183
Ecuación [14]	119	Ecuación [45]	214
Ecuación [15]	123	Ecuación [46]	214
Ecuación [16]	123	Ecuación [47]	214
Ecuación [17]	125	Ecuación [48]	215
Ecuación [18]	125	Ecuación [49]	215
Ecuación [19]	125	Ecuación [50]	227
Ecuación [20]	152	Ecuación [51]	259
Ecuación [21]	152		
Ecuación [22]	152		
Ecuación [23]	152		
Ecuación [24]	152		
Ecuación [25]	157		
Ecuación [26]	158		
Ecuación [27]	164		
Ecuación [28]	165		
Ecuación [29]	165		
Ecuación [30]	165		
Ecuación [31]	165		

Este trabajo de Tesis ha sido publicado parcialmente en:

- M.C. Biondic y R. Erra Balsells

"Photochemical Reaction of β -Carbolines in Carbon Tetrachloride Ethanol Mixtures"

J. Photochem. Photobiol., A: Chemistry, **51**, 341, (1990).

- M.C. Biondic y R. Erra Balsells

"Photochemical Reaction of Harmaline I. Electronic Spectra"

J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2, 1049, (1992).

- M.C. Biondic y R. Erra Balsells

"Photochemical Reaction of Harmalol. Part II. Electronic Spectra"

J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2, 887, (1993).

- M.C. Biondic y R. Erra Balsells

"Photochemical Reaction of Dihydro β -Carbolines. Part 3. Some Kinetic Aspects"

Anales Asoc. Quim. Arg., (1993), **81** (4,5) 403.

- M.C. Biondic y R. Erra Balsells

"Photochemical Reaction of β -Carbolines in Halomethanes. Part 2. Chloroform: Electronic Spectra and Kinetics".

J. Photochem. Photobiol., A: Chemistry, **77**, 179, (1994).

El tema de este trabajo de tesis recibió el premio de Ayuda a la Investigación, otorgado por la Comisión Quinto Centenario en nombre del gobierno español, cuyo monto: fue 600000 pesetas, para el periodo mayo de 1991 a mayo de 1992.

INTRODUCCIÓN

En el presente trabajo de tesis se han estudiado algunos aspectos del comportamiento fotoquímico de las β -carbolinas en solución, en solventes orgánicos, en presencia de compuestos halogenados alifáticos.

Las β -carbolinas presentan en su estructura un anillo indólico fusionado a uno piridínico (9H-pirido[3,4b]indoles). Debido a la presencia simultánea del nitrógeno piridínico y del nitrógeno indólico es posible tener en solución a las β -carbolinas en sus formas neutra (N), aniónica (A), protonada (catiónica: C) y zwitteriónica (Z), las que se muestran en la Figura 1.

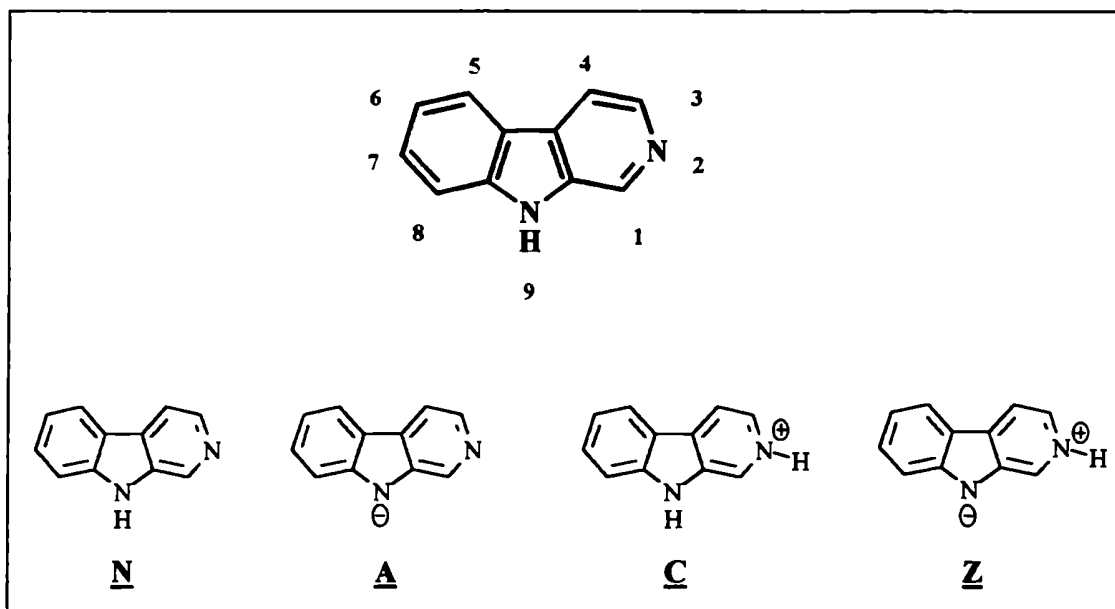


Figura 1 Estructura general de las β -carbolinas

En las β -carbolinas naturales de bajo peso molecular los grupos sustituyentes están presentes comúnmente en las posiciones 1 y 7, así como también el anillo piridínico puede aparecer 3,4-dihidrogenado o bien 1,2,3,4-tetrahidrogenado.

En este trabajo se utilizaron las β -carbolinas que se muestran en la Figura 2

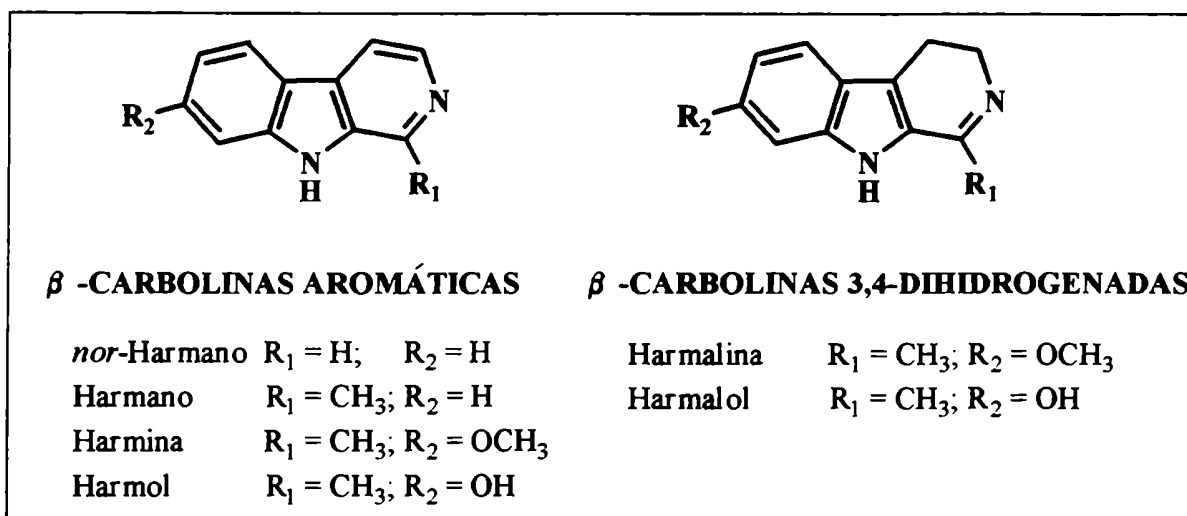


Figura 2 Estructura de las β -carbolineas usadas en este trabajo.

Cabe señalar que en el caso del harmol y del harmalol han sido propuestas también las estructuras resultantes de protonar o desprotonar el grupo hidroxilo.

Las β -carbolineas se encontraron en diversas especies vegetales. Entre otras se encuentran presentes en *Peganum harmala* L. (Zygophyllaceae) y en *Passiflora* sp (Passiphloraceae), *Arundo donax* L. (Gramineae) y *Mucuna pruriens* DC (Leguminoseae)¹. Así, de las semillas de *Peganum Harmala* (Zygophyllaceae) se aisló harmina como componente mayoritario, junto con harmalina, harmalol y harmano². También se aislaron harmina, harmalina y (+) tetrahydroharmina de varias especies del género *Banisteriopsis* (*B. caapi*, *B. inebrians*, *B. rusbyana*) (Malpighiaceae)². Estas plantas eran usadas como base de una bebida narcótica conocida como "ayahuasca", "caapi" o "yajé" usada por nativos del Río Negro, Brasil, y partes adyacentes de Colombia, así como por los indios de la Amazonia peruana y boliviana para ritos de iniciación debido a sus propiedades alucinógenas.

Estas sustancias también pueden obtenerse por síntesis. La ruta más tradicional es la reacción de triptofano (o algún derivado conveniente de éste) con formaldehído y posterior oxidación³. Otra estrategia más moderna es la que involucra la metalación y sustitución intramolecular del ácido (2-aminobencen)borónico con *orto*-fluoriodopiridinas⁴. Actualmente estos alcaloides son drogas comerciales.

CAPÍTULO 1

ESPECTROSCOPIA ELECTRÓNICA



Introducción

Para poder iniciar el estudio del comportamiento fotoquímico de las β -carbolinas en solventes orgánicos debimos realizar primero el estudio de sus espectros electrónicos: de absorción UV-vis. y de emisión y de excitación fluorescentes y en algunos casos de emisión y de excitación fosforescentes.

La mayoría de los estudios espectroscópicos descriptos en la literatura para esta familia de alcaloides se habían realizado en medio acuoso. Uno de los primeros es el realizado por Hadley y col.⁵, en donde se describe la emisión fluorescente y fosforescente de las β -carbolinas. En él se muestran los espectros del *nor*-harmano, el harmano, la harmina, el harmol, la harmalina y el harmalol en soluciones acuosas a un dado pH, y se detallan además los cambios observados en los mismos al agregar ácido o base a las soluciones correspondientes (rango de pH estudiado: 1 a 11). Para estas experiencias se usó un fluorómetro muy elemental, debiendo utilizarse concentraciones de β -carbolina del orden de 5×10^{-4} M, un orden mayor que la de las usadas normalmente, razón por la cual los espectros descriptos presentan deformaciones debido al fenómeno de filtro interno. Los autores no efectuaron la asignación de las bandas observadas, es decir no indicaron si las mismas pertenecen a las especies neutra, protonada, aniónica o zwitteriónica.

Wolfbeis y col. efectuaron estudios de la dependencia con el pH, en soluciones acuosas, de los espectros de absorción y emisión fluorescente del harmano⁶, de la harmina y del harmol⁷. En el caso del harmano, así como en el de la harmina, detectaron tres especies, a través de los espectros de absorción, en el estado electrónico fundamental: catión (C), especie neutra (N) y anión (A), y, a través de los espectros de emisión, cuatro especies en el estado electrónico excitado: C, N, A y zwitterión (Z). Paralelamente midieron el rendimiento cuántico de fluorescencia para las distintas especies del harmano, siendo el valor más alto obtenido el del catión. También observaron que la fluorescencia de éste no era quencheada por el agregado de iones cloruro al medio con lo cual podría usarse éste como una referencia de fluorescencia con mejores propiedades que el sulfato de quinina. En el caso del

harmol, debido a la presencia del grupo hidroxilo en su estructura, los espectros resultaron más complicados. Así, en el espectro de absorción se observaron cuatro bandas diferentes mientras que en el de emisión sólo tres. Los autores propusieron que esto se debería a que en solución acuosa no se ve la banda de emisión propia de la especie neutra, la que sí es detectada en solventes orgánicos como benceno y metanol. Esta ausencia podría deberse al solapamiento entre la banda de fluorescencia de la especie neutra con la banda de absorción del zwitterión, hecho que conduciría a la reabsorción de la fluorescencia en el mismo seno de la solución (filtro interno) o bien, a que en la molécula neutra fotoexcitada simultáneamente se produciría la disociación del grupo hidroxilo y la protonación del nitrógeno piridínico para formar así el zwitterión.

También en 1982 se publicó un estudio muy detallado del comportamiento fluorescente del *nor*-harmol en función del pH (soluciones acuosas) realizado por Sakurovs y Ghiggino⁸. Usando técnicas de fluorescencia de estado estacionario y resuelta en el tiempo, se midieron los tiempos de vida medios de fluorescencia (τ) del catión a distintos valores de pH y del zwitterión a pH 14, pero no se pudo medir el de la especie neutra ya que su tiempo de vida era menor que 300 ps (límite del equipamiento usado). En 1985, Ghiggino y col.⁹ propusieron al *nor*-harmol en su forma catiónica como referencia de fluorescencia. Al usar *nor*-harmol en H₂SO₄ 1N, el τ resultó ser 22,0 ns, mostrando un decaimiento monoexponencial y siendo el rendimiento cuántico de fluorescencia $\Phi_f = 0,60$. Estas características, sumadas a la solubilidad en agua y la insensibilidad mostrada por la fluorescencia a la presencia de oxígeno y/o iones haluro en el medio, lo hacen un compuesto altamente conveniente para ser usado como referencia en fluorometría.

F. Tomas Vert y col.¹⁰⁻¹⁴ realizaron una serie de trabajos utilizando las β -carbolas aromáticas y las parcialmente hidrogenadas (harmalina y harmolol) en medios acuosos determinando los valores de la constante de equilibrio ácido-base tanto en el estado fundamental como en los estados electrónicos excitados singulete y triplete. La asignación de las bandas de las distintas especies de las β -carbolas aromáticas resultó coincidente a la

realizada por los autores antes mencionados.

Dogra y Krishnamurthy¹⁵ estudiaron la fluorescencia de la harmalina y del harmalol en soluciones acuosas en el rango de pH comprendido entre 2 y 14, extendiendo el estudio hasta valores de $H_L = 16$. En el caso de la harmalina, dependiendo de la acidez del medio, pudieron detectar tres especies en el estado fundamental (C, N, A) y cuatro en el estado electrónico excitado (C, N, Z, A). En el caso del harmalol detectaron cuatro especies por absorción (C, Z, A y dianión DA) y también cuatro por emisión fluorescente (C, Z, zwitterión aniónico ZA y DA). Estos mismos autores¹⁶ estudiaron el equilibrio prototrópico del harmano, la harmina, el harmol, la harmalina y el harmalol en soluciones acuosas de acidez creciente. Así, pudieron detectar señales que asignaron al monocatión y al dicatión (protonación del C6) en el estado fundamental y al monocatión, dicatión y tricatión (en los casos donde era posible la protonación del oxígeno del grupo hidroxilo o metoxilo) en el estado electrónico excitado.

A. Pardo y col.¹⁷ en un trabajo reciente propusieron usar no sólo el *nor*-harmano como referencia de fluorescencia, como ya lo habían hecho Ghiggino⁹ y Wolfbeis⁶ previamente, sino que además propusieron con el mismo fin al harmano, la harmina, la 2-metil-harmina y la harmalina en soluciones de H_2SO_4 0,1 N.

Recientemente, Macanita y col.¹⁸ calcularon las densidades de carga en los estados electrónicos fundamental y excitado singlete usando los métodos INDO/S-CI y PPP, con la geometría molecular optimizada por el programa de mecánica molecular PCModel (Serena Software, Bloomington, IN). Las transiciones calculadas a partir de estos modelos teóricos y los datos experimentales obtenidos de los espectros de absorción confirmarían que el estado excitado singlete de menor energía (S_1) del *nor*-harmano, así como el del harmano y el de la harmina, sería de tipo $\pi-\pi^*$. Por el contrario, en el caso de la harmalina éste sería de tipo $n-\pi^*$. Esto podría deberse, en opinión de los autores, a que la disminución de la conjugación en el sistema resultaría en un aumento de la energía del estado S_1 $\pi-\pi^*$ la que sería ahora mayor que la del estado S_1 $n-\pi^*$.

1.1 β -Carbolinas aromáticas

1.1.1 *Espectros de absorción UV-vis en medios líquidos*

En el presente trabajo al referirnos a espectros electrónicos de absorción UV-vis. describimos a aquéllos realizados en el intervalo de longitudes de onda comprendido entre 250 y 800 nm en medios líquidos a 298 K. Estos espectros nos permiten observar dos de las tres bandas de absorción más importantes descritas para las β -carbolinas aromáticas^{18,19}. Para los estudios y correlaciones realizados, la banda más importante es la de menor energía, por lo tanto el no poder ver y caracterizar a la de mayor energía no afecta mayormente nuestros resultados y conclusiones. La razón por la cual la banda que aparece a menor longitud de onda no fue monitoreada es que en las condiciones experimentales en que se realizan algunos de los estudios espectroscópicos (solución líquida a temperatura ambiente en presencia de halometanos) la irradiación con longitudes de onda menores de 250 nm durante el proceso de medición produce la fotodescomposición parcial de las β -carbolinas.

Como se describe en las Tablas 1 a 4, al realizar los espectros de las β -carbolinas aromáticas en solventes orgánicos puros sólo se observan las bandas correspondientes a las especies neutras.

En estos casos, la primer banda observada (entre 320 y 352 nm) se interpreta como debida a una transición π - π^* permitida. Esta interpretación es avalada por el hecho que en el espectro de la β -carbolina protonada (especie catiónica) esta banda se desplaza considerablemente hacia mayores longitudes de onda, siendo este comportamiento característico de las bandas π - π^* menos energéticas en moléculas aromáticas heteroatómicas con alta conjugación. Los dos máximos que presenta esta señal se deberían simplemente a la estructura vibracional de la misma. Esto está de acuerdo con la asignación de las bandas de absorción hecha independientemente por Macanita y col. y por Tomas Vert y col.,

basándose en métodos de cálculo diferentes. Tomas Vert¹⁹, cuyo trabajo es anterior (1979), hace uso del método de cálculo CNDO/S-CI, con una geometría lógica. De esta manera encuentra que la primer banda se debería a una transición del tipo $\pi-\pi^*$. Posteriormente, Macanita¹⁸ (1992) basándose en el método INDO por un lado y en el método PPP por el otro, con una geometría optimizada por el método MMX, llegó a la misma conclusión.

La segunda banda (ubicada entre 284 y 304 nm) también es asignada en ambos trabajos a una transición de tipo $\pi-\pi^*$, la cual solaparía parcialmente, por encontrarse en las cercanías, a una transición de tipo $n-\pi^*$. Ésta experimentalmente aparece como un hombro a aproximadamente $\lambda = 280$ nm, en el caso del *nor*-harmano y del harmano (Figuras 3A y 3B), quedando en el caso de la harmina y el harmol totalmente solapada (Figuras 3C y 3D).

Los espectros de absorción obtenidos en los diferentes medios se describen en las Tablas 1 a 4. Como puede verse, las soluciones en solventes orgánicos acidificados presentan espectros de absorción totalmente diferentes (Figura 3) siendo éstos muy similares a aquéllos previamente descriptos^{11,13,20} para las β -carbolinas en soluciones acuosas y etanólicas a pH 1. Por lo tanto las nuevas señales observadas se pudieron asignar a la correspondiente especie protonada formada.

En el caso de la especie protonada, todas las bandas observadas corresponderían a transiciones de tipo $\pi-\pi^*$, desapareciendo como es lógico las de tipo $n-\pi^*$. Esto es debido a que el sitio de protonación de la molécula es el N piridínico, cuyo par de electrones n pierde su carácter atómico, estabilizándose energéticamente al constituir el orbital molecular σ correspondiente.

Es sabido que el reemplazo de un grupo metino en un compuesto aromático policíclico por un átomo de N tiene poca incidencia en la forma del espectro de absorción²¹. Si se comparan los espectros de absorción del *nor*-harmano con su análogo aromático sin N piridínico, el carbazol y a su vez con los del análogo hidrocarbonado, el

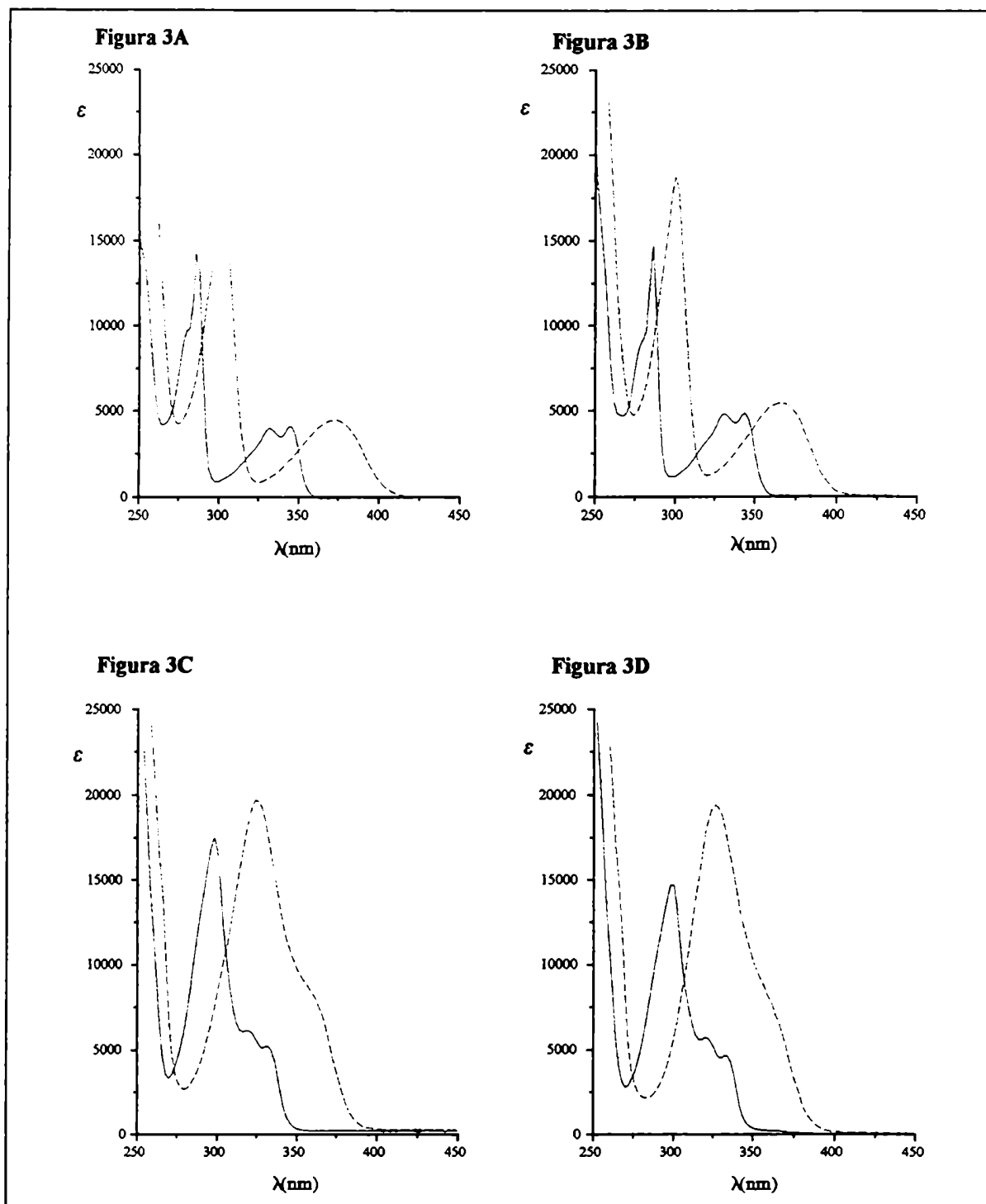


Figura 3 Espectros de absorción UV-vis. de β -carbólinas aromáticas en MeCN (—) y MeCN acidificado (---). 3A: nor-harmano, 3B: harmano, 3C: harmina, 3D: harmol; T: 298K

fenantreno se observan los mismos tipos de bandas. Tener un anillo de 5 miembros con un N equivale a tener un grupo $-\text{CH}=\text{CH}^{21}$, es decir, el espectro del carbazol se parece más al del fenantreno que al del fluoreno o el antraceno.

Haciendo la asignación de las bandas según la clasificación propuesta por Clar²² tanto en el caso del carbazol como en el del fenantreno se distinguen tres bandas. En el carbazol éstas se encuentran en las regiones de longitudes de onda comprendidas entre 250-280 nm, 290-300 nm y 320-340 nm tanto en solventes polares como no polares. Dichas bandas han sido asignadas²³ a transiciones del tipo $^1\text{A}-^1\text{L}_\text{b}$ y $^1\text{A}-^1\text{L}_\text{a}$ y a una mezcla de transiciones $^1\text{A}-^1\text{B}_\text{b}$, $^1\text{A}-^1\text{B}_\text{a}$, no pudiendo ser asignadas unívocamente las dos últimas transiciones debido a la falta de resolución de dicha banda en el espectro electrónico de absorción UV.

Pero la asignación de las bandas de las β -carbolinas se ve complicada porque debe tenerse en cuenta también que cuando el átomo de N se integra a un ciclo en la forma piridinica, es decir dejando un par de electrones sin compartir, confiere al compuesto dos características distintas respecto del análogo hidrocarbonado: una es la posibilidad de presentar bandas asociadas a transiciones de tipo $\text{n}-\pi^*$ y la otra es la adquisición de carácter básico. Debido al bajo valor de la integral de recubrimiento, las transiciones $\text{n}-\pi^*$ son poco probables caracterizándose por un coeficiente de absorción molar ϵ pequeño y muchas veces quedan solapadas por transiciones $\pi-\pi^*$ más intensas, viéndose también muy afectadas por la capacidad de formar puentes de hidrogeno del solvente²⁴. Así, por ejemplo, en la quinolina se observa la transición $\text{n}-\pi^*$ en fase gaseosa y en matrices rígidas de solventes hidrocarbonados pasando a verse sólo la transición $\pi-\pi^*$ en solventes de mayor polaridad²⁴. Además, en los casos de análogos estructurales de las β -carbolinas, como son la acridina y quinolina, es conocido que la especie protonada absorbe más hacia el rojo²⁵.

1.1.2 *Espectros de emisión fluorescente en medios líquidos*

Los valores de las longitudes de onda correspondientes a los máximos de emisión fluorescente de las β -carbolinas aromáticas en distintos solventes orgánicos a 298 K se presentan en las Tablas 1 a 4. Comparando el espectro de emisión obtenido en el solvente orgánico puro con aquel registrado en el solvente orgánico acidificado, las bandas que aparecen entre 410 y 483 nm fueron asignadas a la forma catiónica de cada β -carbolina (Tablas 1 a 4). En la Figura 4 se muestran como ejemplo los espectros obtenidos en etanol. Este marcado corrimiento hacia el rojo de la emisión de la especie protonada también se observa en otros compuestos nitrogenados aromáticos tales como la quinolina y la acridina^{25,26}.

En todos los casos se registraron los espectros de absorción UV-vis de las soluciones antes y después de ser usadas para las mediciones de luminiscencia. Dado que en general, éstas no mostraron cambios espectroscópicos apreciables podemos concluir que durante la medición luminiscente no se produciría una fototransformación detectable.

En los solventes orgánicos utilizados se observó casi exclusivamente la señal correspondiente a la especie neutra. Un caso excepcional fue el del metanol. En este solvente se observaron unos hombros que corresponderían, de acuerdo a la información de la literatura, a la especie catiónica y a la zwitteriónica. Estos hombros anteriormente habían sido asignados a la especie neutra⁶ como parte de la estructura vibracional de esa banda pero gracias a estudios realizados con técnicas de fluorescencia resuelta en el tiempo¹⁸ ha sido posible realizar su correcta asignación. Los correspondientes espectros de excitación, que se discuten en detalle en la siguiente sección, resultaron similares para todas las λ_{em} estudiadas, con lo cual se puede concluir que tanto el catión como el zwitterión se formarían en el estado electrónico excitado.

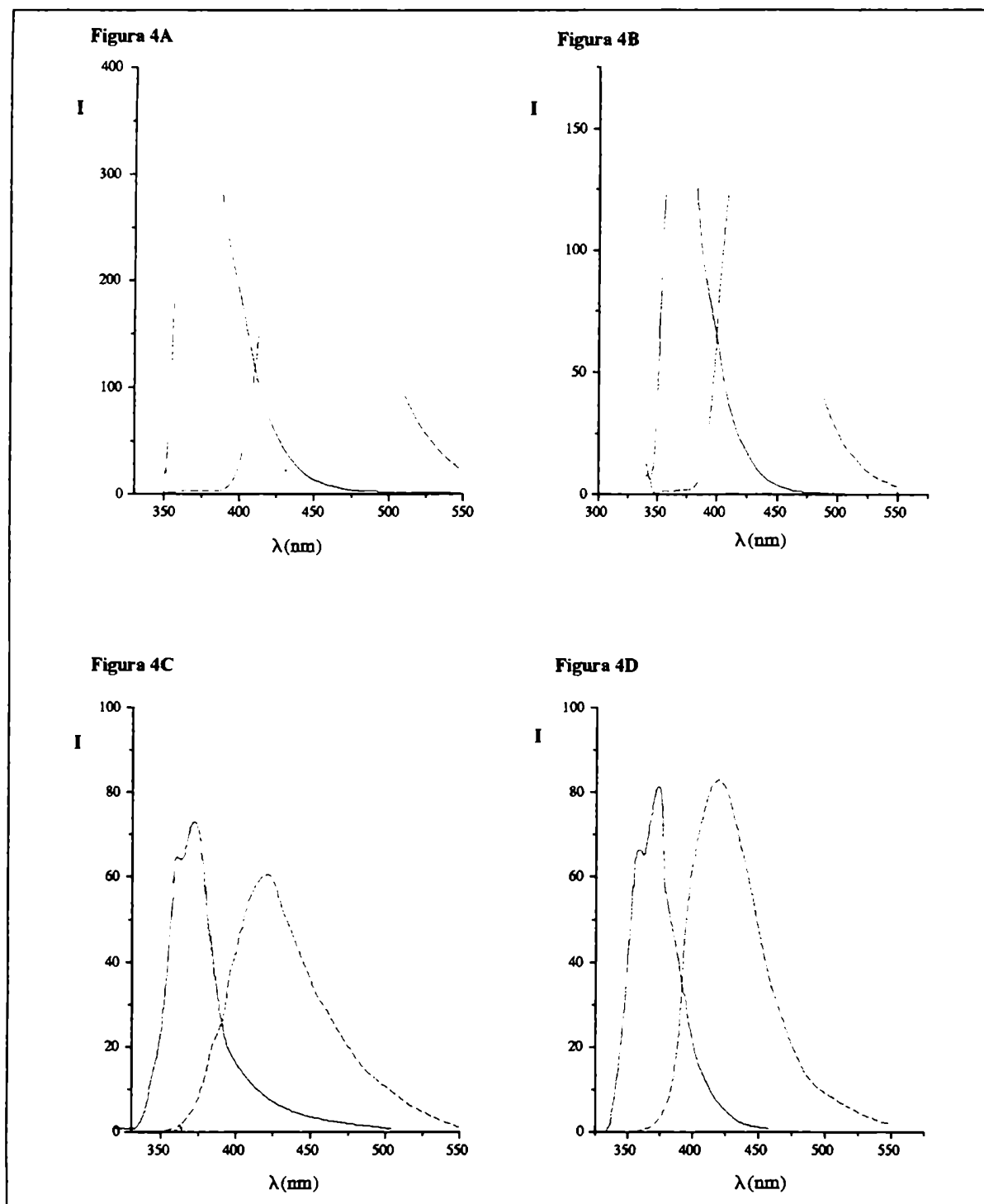


Figura 4 Espectros de emisión fluorescente de β -carbólinas aromáticas en EtOH, λ_{exc} : 286 nm (—) y EtOH acidificado λ_{exc} : 336 nm (----). **4A:** nor-harmano, **4B:** harmano, **4C:** harmina, **4D:** harmol; T: 298 K.

1.1.3 *Espectros de excitación fluorescente en medios líquidos*

Los espectros de excitación fluorescente obtenidos a 298 K resultaron, en la mayoría de los casos, similares en forma a los espectros de absorción correspondientes. Este hecho se debe a que los primeros reflejan el cambio de la intensidad de la fluorescencia a una dada longitud de onda de emisión con la variación de la longitud de onda de excitación. Para una solución diluida de un dado soluto, a una dada concentración, la intensidad de fluorescencia es proporcional a la intensidad de la lámpara, al coeficiente de absorción molar (ϵ) y al rendimiento cuántico de fluorescencia (Φ_f) a esa longitud de onda. Si la intensidad de la lámpara se mantiene constante en el rango de longitudes de onda de excitación, considerando que en general para moléculas orgánicas el Φ_f es casi independiente de la longitud de onda de excitación, entonces la intensidad de fluorescencia es proporcional a ϵ , con lo cual es razonable que el espectro de excitación resulte ser una réplica del espectro de absorción²⁷. Este comportamiento se observó para todas las β -carbolinas aromáticas en todos los solventes orgánicos seleccionados para realizar este estudio, como puede verse en las Tablas 1 a 4. En la Figura 5 se muestran, a modo de ejemplo, los espectros del *nor*-harmano en 2-metil-2-propanol (t-BuOH) y los de la harmina en acetonitrilo. Cabe señalar que si bien en los espectros de absorción no se detectaron cambios significativos, la presencia de más de un 5% de agua en los solventes orgánicos produce una pequeña cantidad de especie protonada la cual sí es detectada en los espectros de excitación a λ_{em} convenientemente seleccionados y en los espectros de emisión obtenidos a ciertas λ_{exc} .

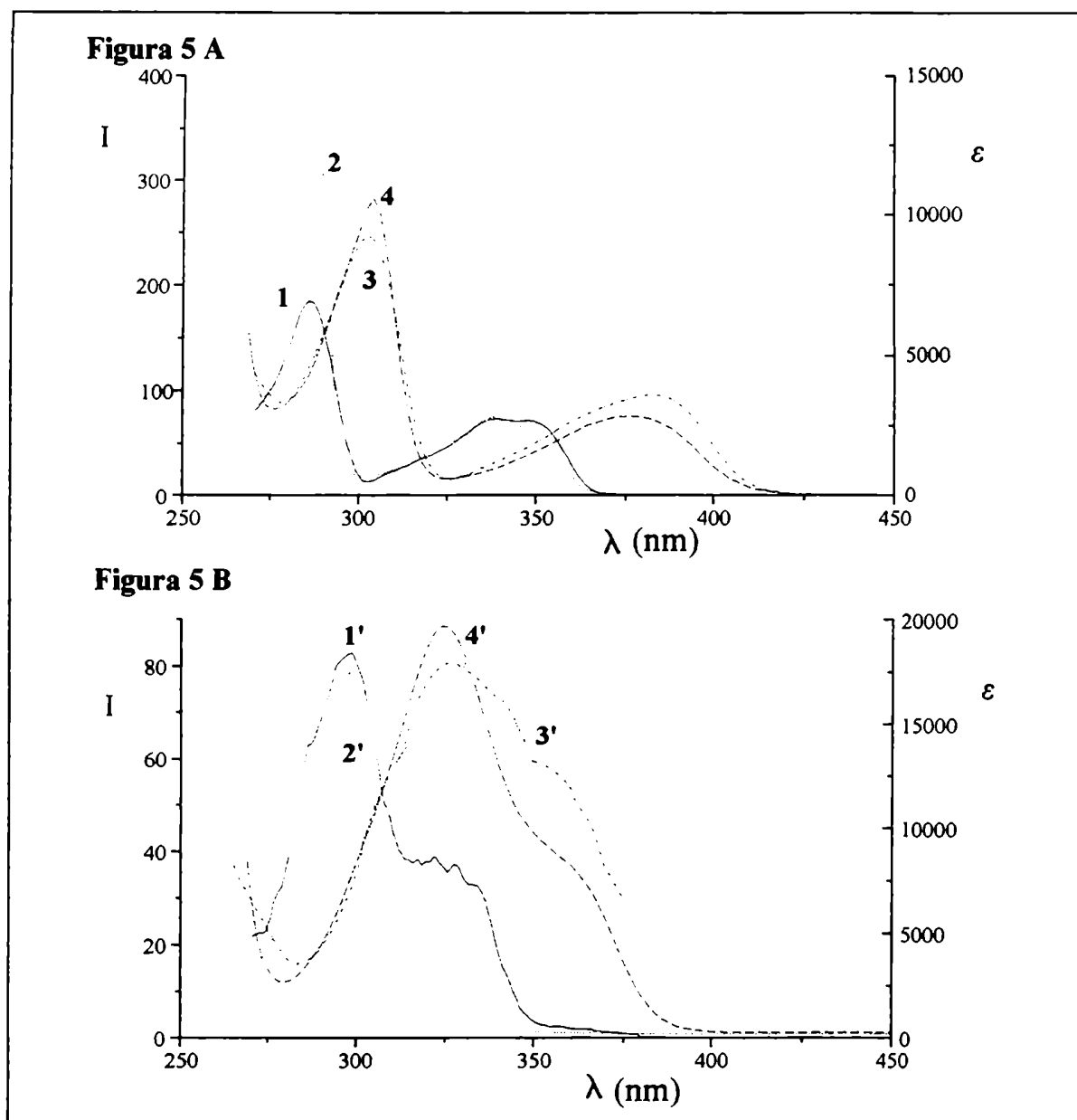


Figura 5 Espectros de excitación fluorescente y de absorción. **5A nor-harmano** en *t*-BuOH: 1 (—) λ_{em} 410 nm, 2 (.....) absorbancia y en *t*-BuOH acidificado 3 (— · — ·) λ_{em} 450 nm, 4 (-----) absorbancia. **5B harmina** en MeCN 1' (—) λ_{em} 400 nm, 2' (.....) absorbancia y en MeCN acidificado 3' (— · — ·) λ_{em} 420 nm, 4' (-----) absorbancia; T: 298K.

Tabla 1 Espectros electrónicos de absorción UV-vis, y de emisión y excitación fluorescentes del *nor-harmano* en solventes orgánicos a 298 K.

Solvente	Absorción(a)		Emisión			Excitación		
	$\lambda_{\text{máx}}^{(b)}$	$\log \epsilon$	λ_{exc}	$\lambda_{\text{máx}}$	I(c)	λ_{em}	$\lambda_{\text{máx}}$	I
MeOH	288	4,22	286	368(h)	400	380	250	360
	338	3,59		379	450		287	330
	350	3,59		430(h)	180		338	220
			306	368(h)	56		350	220
				378	66	440	250	135
				430(h)	27		287	120
			390	-	-		338	80
							350	80
MeOH + AP(d)	302	4,19	286	447	720	380	273	10
	374	3,63	306	449	950		284	10
							315	80
							334(h)	6
						440	258	910
							302	980
							372	680
						480	258	550
							302	590
							372	420
EtOH	290	4,22	286	368	790	380	246	900
	338	3,63		379	890		286	820
	352	3,64	306	368	130		336	510
				379	140		350	505
						440	246(h)	88
							286	74
							336	42
							350	42
EtOH + AP	304	4,22	286	446	750	390	260	6
	376	3,64	306	446	840		302	6
						440	260	990
							302	910
							385	660

Tabla 1 Continuación

n-PrOH	290 338 352	4,25 3,62 3,63						
n-PrOH + AP	304 376	4,21 3,63						
i-PrOH	290 338 352	4,25 3,62 3,63	286 306	362 377 362 377	620 700 130 110	380 440 520	244 280(h) 288 338 352 244 288 338 352 -	910 800 870 450 450 40 39 22 22 -
i-PrOH + AP	304 376	4,22 3,65	286	442	790	440	306 387	990 700
t-BuOH	290 338 352	4,21 3,68 3,68	286 306	361 376 361 376	650 700 135 145	390 440	252 280(h) 287 337 351 252 280(h) 288 339 353	420 550 610 350 350 35 35 38 23 23
t-BuOH + AS(e)	302 374	4,26 3,69	286	440	860	390 440	258 300 258 300 380	16 15 990 990 720
MeCN	286 332 346	4,15 3,60 3,61	286 306	354 369 354 370	185 210 45 50	380 440	246 286 332 344 258 332(h) 344(h)	165 155 95 100 26 6 7

MeCN + AP	302 374	4,22 3,65	286 306	448 447	880 990	380 440	- 258 300 370	- 740 700 450
1,4-Dioxano	288 332 346	4,20 3,64 3,67						
1,4-Dioxano + AP	302 374	4,24 3,68						
Eter etílico	288 332 346	4,17 3,62 3,66						
Eter etílico + AP	302 372	4,22 3,64						
Ciclohexano	286 326 340	4,22 3,63 3,71	330 350	347 360 360	184 205 38	400	285 328 340	59 27 27
CH ₂ Cl ₂	286 330 344	4,20 3,63 3,65	286 300	354 367 354 367	420 470 105 120	380	246 285 332 344	320 290 175 180
CH ₂ Cl ₂ + AP	306 376	4,21 3,59	286 306	449 450	740 950	380 440	- 258 304 380	- 950 900 560
CHCl ₃	288 332 344	4,24 3,55 3,60	286 306	354 367 354 367	375 440 95 110	380 450	253 285 330 343 259 302 330(h) 343 360	300 270 160 160 14 17 4 4 4

Tabla 1 Continuación

						375	31
CCl ₄	288	4,25	286	327	35	380	281 7,6
	330	3,68		341	35		295 3,3
	344	3,72		440	2		309 4,1
				530	3		321 5,4
			306	327	35	440	247 2,5
				341	35		305 4,8
				442	5		388 1,5
				530	3		

(a) concentración: $6,0 \times 10^{-5}$ M; $A = \epsilon lc$; A , absorbancia, ϵ en $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$; (b) λ en nm; (c) I , intensidad relativa de emisión; (d) AP, con 1% de ácido perclórico 0,1 M; (e) AS, con 1% de ácido sulfúrico 0,5 M.

Tabla 2 Espectros electrónicos de absorción UV-vis. y de emisión y excitación fluorescentes del **harmano** en solventes orgánicos a 298 K.

Solvente	Absorción(a)		Emisión			Excitación		
	$\lambda_{\text{máx}}^{(b)}$	$\log \epsilon$	λ_{exc}	$\lambda_{\text{máx}}$	I(c)	λ_{em}	$\lambda_{\text{máx}}$	I
MeOH	288	4,23	280	362	510	380	252	660
	336	3,72		375	590		285	600
	350	3,72	306	362	150		335	450
				375	170		348	450
			330	362	390	440	252	130
				375	440		285	120
			370	416	5		335	90
							348	90
MeOH + AP(d)	302	4,26	270	430	790	380	255	11
	368	3,73	286	430	>990		300	10
			306	430	>990	480	257	550
			370	430	970		300	510
							370	300
EtOH	288	4,24	286	362	730	380	252	850
	336	3,72		375	840		286	790
	350	3,72	306	362	170		336	540
				375	200		349	540
			370	413	3	440	252	44
							286	40
							336	27
							349	27
EtOH + AP	302	4,28	270	430	910	380	257	14
	370	3,73	286	430	>990		289	15
			306	430	>990		304	13
			370	428	920	480	258	500
							300	480
							372	340
n-PrOH	288	4,25						
	336	3,72						
	350	3,72						
n-PrOH + AP	302	4,28						
	370	3,72						

Tabla 2 Continuación

i-PrOH	282(h)	4,02	286	360	670	390	245	430
	288	4,27		374	750		286	430
	336	3,73	306	360	180		335	280
	350	3,73		374	200		348	280
						440	245	30
							286	30
							335	22
							348	22
i-PrOH + AP	302	4,30	270	430	990	380	260	12
	370	3,73	280	430	990		300	13
			286	430	>990	480	260	480
			370	430	990		300	500
							372	330
t-BuOH	288	4,13	286	359	720	380	252	810
	336	3,68		374	840		286	730
	348	3,68					338	520
			306	359	200		348	520
				374	220	440	252	30
							286	27
							338	19
							348	19
t-BuOH + AS(e)	300	4,22	270	425	970	380	258	35
	368	3,67	286	425	>990		298	33
			306	425	>990	480	258	550
			370	425	990		300	480
							372	280
MeCN	286	4,17	286	356	420	380	285	330
	330	3,68		369	470		330	210
	344	3,69	306	356	115		342	215
				369	130	440	285	14
			370	—	—		300	13
							330	8
							342	9
MeCN + AP	300	4,27	270	433	840	380	258	11
	366	3,73	286	433	>990		302	10
			306	433	>990	480	262	560
			370	432	850		302	540
							366	350
1,4-Dioxano	286	4,17						

Tabla 2 Continuación

	332	3,70						
	344	3,71						
1,4-Dioxano + AP	300	4,28						
	366	3,74						
Eter etílico	286	4,18						
	332	3,68						
	344	3,69						
Eter etílico + AP	300	4,25						
	368	3,71						
Ciclohexano	284	4,25	330	347	330	400	284	98
	326	3,72		361	387		326	52
	340	3,74	350	360	29		338	54
CH ₂ Cl ₂	286	4,22	286	354	440	390	248	315
	330	3,69		366	520		285	280
	342	3,71	306	354	135		330	185
				366	160		342	190
CH ₂ Cl ₂ + AP	302	4,27	270	436	940	380	255	6
	368	3,66	286	435	>990		289	7
			306	435	>990		298	6
			370	436	870		350	4
						480	258	730
							300	650
							365	440
CHCl ₃	286	4,19	286	353	380	380	252	200
	330	3,67		366	420		376(h)	220
	342	3,67	306	353	90		284	260
				366	110		330	160
			340	353	220		342	160
				366	250	440	256	7
							376(h)	6
							284	7
							297	6
							330	4
							342	5
						520	-	-
CHCl ₃ + AP	302	4,26	286	443	560	380	255	14

Tabla 2 Continuación

	366	3,70	306	442	770		302	12
						480	259	560
							302	480
							365	210
CCl ₄	288	3,51	286	353	2,5	390	286	1,3
	328	3,13		365	2,8		330	1,0
	342	3,14		432	2,0		342	1,0

(a) concentración: $5,5 \times 10^{-5}$ M, $A = \epsilon lc$; A, absorbancia, ϵ en $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$; (b) λ en nm; (c) I, intensidad relativa de emisión; (d) AP, con 1% de ácido perclórico 0,1 M; (e) AS, con 1% de ácido sulfúrico 0,5 M.

Tabla 3 Espectros electrónicos de absorción UV-vis, y de emisión y excitación fluorescentes de la **harmina** en solventes orgánicos a 298 K.

Solvente	Absorción(a)		Emisión			Excitación		
	$\lambda_{\text{máx}}^{(b)}$	$\log \epsilon$	λ_{exc}	$\lambda_{\text{máx}}$	I(c)	λ_{em}	$\lambda_{\text{máx}}$	I
MeOH	300	4,24	280	354(h)	300	380	252	490
	324	3,80		367	350		300	430
	336	3,74		415(h)	120		326	280
			300	354(h)	490		336	275
				367	590	420	252	225
				415(h)	210		300	190
			330	354(h)	370		326	135
				367	380		336	130
				415(h)	150	480	252	82
			380	-	-		300	70
							326	50
							336	49
MeOH AB(d)	300	4,20	280	354(h)	285	380	252	510
	324	3,72		367	330		300	440
	336	3,66		410(h)	120		325	280
			300	354(h)	490		336	270
				367	580	400	252	225
				410(h)	220		300	190
			330	354(h)	310		325	125
				367	360		336	120
				410(h)	140	420	252	310
			380	-	-		300	265
							325	170
							336	160
MeOH + AS(e)	324	4,28	260	420	710	390	239	330
	360(h)	3,91	302	417	460		257	330
			322	419	690		330	310
							360(h)	240
						440	239	600
							257	600
							330	560
							360(h)	440
EtOH	302	4,28	300	354(h)	770	380	252	550
	324	3,80		367	830		300	650
	338	3,75	330	354(h)	530		325	420
				367	590		336	410
			370	414	5	420	252	150

Tabla 3 Continuación

MeCN	298	4,21	300	350(h)	560	380	253	360
	324	3,72		362	640		295	360
	332	3,68	330	350(h)	350		320	230
				362	405		331	220
			370	---	---	420	253	36
							295	35
							320	25
							331	24
MeCN + AS	324	4,30	280	420	170	380	258	74
	360(h)	3,92	300	420	550		328	74
			330	420	780	420	258	800
			370	420	480		330	800
CH ₂ Cl ₂	298	4,23	300	346	650	380	252	330
	318	3,79		358	770		295	350
	332	3,71	330	358	480		318	230
			370	---	---		330	220
						420	252	33
							295	28
							318	25
							336(h)	7
CH ₂ Cl ₂ + AP ^(f)	330	4,30	280	420	100	380	260	47
	370(h)	3,84	300	420	480		330	47
			330	419	520	420	258	550
			370	420	340		332	520
							360(h)	390
CHCl ₃	300	4,22	300	346	450	380	258	190
	324	3,82		358	520		298	250
	332	3,76	326	348	310		320	190
				358	350		332(h)	170
			332	359	280	440	258	22
							290(h)	20
							325	28
							360(h)	10
CHCl ₃ + AP	328	4,26	280	421	130	380	258	44
			300	420	265		332	45
			330	420	560	420	259	570
			370	419	375		332	560
							365(h)	410
						440	258	315

Tabla 3 Continuación

						332 365(h)	300 220	
CCl ₄	300	3,63	270	419	3	380	270	1,0
	318(h)	3,6	300	357	1		335	3,0
	332	3,17		413	1	420	270	4,0
			330	360	1		337	14,0
				413	20		370(h)	5,0
			370	419	3,5			

(a) concentración: $4,7 \times 10^{-5}$ M; $A = \epsilon lc$; A , absorbancia, ϵ en $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$; (b) λ en nm; (c) I , intensidad relativa de emisión; (d) AB: solvente filtrado a través de una columna de cromatografía rellena con alúmina básica, (e) AS, con 1% de ácido sulfúrico 0,5 M; (f) AP, con 1% de ácido perclórico 0,1 M.

Tabla 4 Espectros electrónicos de absorción UV-vis y de emisión y excitación fluorescentes del **harmol** en solventes orgánicos a 298 K.

Solvente	Absorción(a)		Emisión			Excitación		
	$\lambda_{\text{máx}}^{(b)}$	$\log \epsilon$	λ_{exc}	$\lambda_{\text{máx}}$	I(c)	λ_{em}	$\lambda_{\text{máx}}$	I
MeOH	302	4,27	280	352(h)	210	380	256	310
	324(h)	3,87		366	270		300	280
	338	3,77		410(h)	140		324	230
				456	90		336	210
			300	352(h)	320	420	256	215
				365	400		304	200
				410(h)	210		324	180
				456(h)	140		330	170
			330	352(h)	240	460	256	160
				365	310		304	140
				410(h)	180		324	125
				456(h)	120		336	120
			380	460	12		390	12
MeOH + AS(d)	330	4,17	280	416	105	380	254	64
			300	419	300		330	60
			330	417	700	420	254	730
			380	416	200		332	700
EtOH	304	4,21	260	353(h)	700	380	255	620
	326(h)	3,86		367	800		302	580
	338	3,77	300	353(h)	525		337	370
				366	700			
EtOH + AS	330	4,29	300	419	420	380	257	60
			330	420	750		335	60
						440	258	700
							336	700
i-PrOH	304	4,21	260	352	770	380	254	580
	324(h)	3,80		365	820		303	550
	338	3,74	340	352	450		323(h)	420
				365	580		336	370
			300	352	670	420	256	70
				365	900		304	66
			330	352	480		323(h)	50

Tabla 4 Continuación

			366	600		440	335 254 302 323(h) 335	45 25 23 19 18
i-PrOH + AS	332	4,25	300 330	417 417	400 830	380 420 440	265 334 264 332 264 332	63 65 700 700 570 600
t-BuOH	304 326 338	4,22 3,82 3,69	300 330	351 364 351 364	720 900 530 700	380 420	258 300 324 336 258 300 326 338	550 500 400 350 65 57 48 45
t-BuOH + AS	330	4,32	300 330	414 415	400 750	380 420	262 327 258 336	100 110 750 740
MeCN	300 322(h) 334	4,18 3,77 3,65	300 330	348(h) 359 349(h) 360	530 660 335 410	380 420	252 296 320 332 256 295 318 330	350 340 230 215 35 30 25 24
MeCN + AS	326	4,30	300 330	421 423	400 680	380 420	258 336 258 332	50 53 650 710

Tabla 4 Continuación

CH ₂ Cl ₂	298	3,74	280	345	260	380	296	260
	320	3,35		356	350		318	140
	334	3,28	300	345	470		330	125
				356	570	420	296	18
			330	356	280		320	11
			370	-	-		332	10
<hr/>								
CHCl ₃	326	3,60	280	395	7	380	251	65
			300	395	40		322	65
			330	394	70		350(h)	35
			380	449	4	420	251	53
							322	55
							350(h)	30
						450	251	20
							322	21
							350(h)	13
							390(h)	4
<hr/>								
						550	-	-

(a) concentración: $5,0 \times 10^{-5}$ M; $A = \epsilon lc$; A , absorbancia, ϵ en $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$; (b) λ en nm; (c) I , intensidad relativa de emisión; (d) AS, con 1% de ácido sulfúrico 0,5 M.

1.1.4 Espectros electrónicos de excitación y emisión en medios rígidos

Matrices de EtOH a 77K

Cuando se realizaron los espectros luminiscentes de la harmina y el harmol en soluciones etanólicas a 77 K (Tabla 5) se observaron los siguientes efectos provocados por la rigidez del medio: aumento de la resolución de los espectros y un leve corrimiento hipsocrómico en el caso de los espectros de emisión fluorescente y simultáneamente, uno de tipo batocrómico en los de excitación, respecto de los registrados a temperatura ambiente (298 K) como se puede ver en la Figura 6. En el caso del harmol se realizaron también los espectros en soluciones etanólicas con agregado de ácido sulfúrico. Se observó una notable mayor resolución de los distintos picos de emisión, además de su corrimiento hacia el azul (Figura 6B, espectros 6, 7, 8 y 9). Una posible explicación para este comportamiento es postular la existencia de dos estados electrónicos excitados con la misma multiplicidad y con casi la misma energía. En esta situación, a temperatura ambiente, la conversión interna al estado de menor energía ocurriría inmediatamente después de la excitación. Esta conversión interna estaría restringida en el caso de la matriz sólida a baja temperatura, con lo cual habría también emisión desde el estado excitado de Franck Condon observándose entonces dos bandas. En este caso el espectro de excitación no presentaría cambio alguno. De todas formas en nuestro caso esta explicación no sería la correcta ya que el átomo de nitrógeno piridínico del harmol en medio ácido está unido a un H^+ siendo entonces la población de un estado electrónico excitado del tipo $n-\pi^*$ la que genere la situación antes descrita, poco probable. Otra posible explicación es considerar que la pérdida de resolución de la banda a temperatura ambiente podría deberse a la formación de un excímero. Esta última posibilidad queda descartada porque el comportamiento fluorescente para todas las β -carbolinas estudiadas resulta independiente de la concentración de la solución en el rango comprendido entre 10^{-3} y 5×10^{-6} M. Las modificaciones que se producen en el entorno molecular en fase sólida a 77 K respecto del ordenamiento molecular a temperatura ambiente serían el origen

de las diferencias observadas en el espectro de fluorescencia. Como es sabido, la rigidez del entorno vítreo retarda la relajación vibracional del entorno molecular. Además en este medio rígido las interacciones soluto solvente de la especie catiónica por tener una carga neta son más fuertes que las de la especie neutra. Como la relajación vibracional está restringida a 77 K respecto de aquella a temperatura ambiente donde el reacomodamiento de la caja de solvente es libre, la fluorescencia a 77 K ocurre a longitudes de onda menores²⁸. También es digno de señalar que en el caso del harmol al usar etanol sin agregado de ácido se detectaron trazas de la especie catiónica tanto en el estado electrónico fundamental, a través de los espectros de excitación, como en el estado electrónico excitado, a través de los espectros de emisión (Tabla 5). Cuando se utilizó etanol absoluto no se detectaron trazas de la especie catiónica sino de la especie zwitteriónica (Figura 6B, espectro 5). En el caso de la harmina no se observaron este tipo de señales. Este resultado indicaría que en estas condiciones experimentales el harmol se comportaría como un compuesto levemente más básico que la harmina.

Tanto la harmina como el harmol presentaron fosforescencia al realizar los espectros correspondientes a 77 K. Como era de esperar las señales aparecieron a longitudes de onda mayores que las correspondientes a las señales de fluorescencia. Las bandas que se observaron en el caso de usar etanol acidificado fueron asignadas a la especie protonada y las que se observaron en la solución etanólica a la especie neutra.

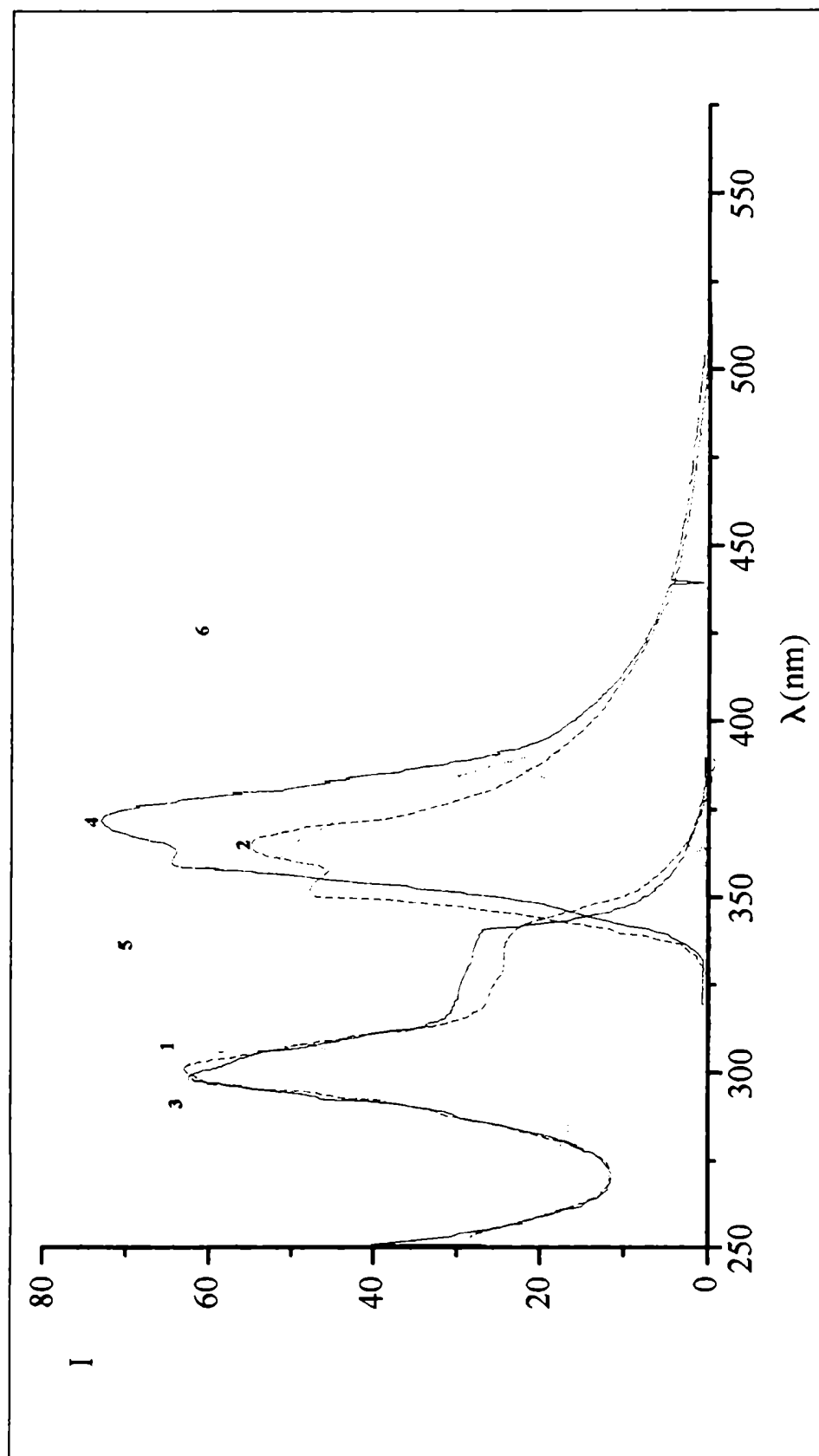


Figura 6A Espectros de excitación y emisión fluorescentes de la **harmina** en EtOH a 77 K (----- λ_{em} : 420 nm **1**, λ_{exc} : 330 nm **2**) y 298 K (— λ_{em} : 420 nm **3**, λ_{exc} : 330 nm **4**), y en EtOH + 1% H₂SO₄ 0,5 M a 298 K (..... λ_{em} : 415 nm **5**, λ_{exc} : 300 nm **6**).

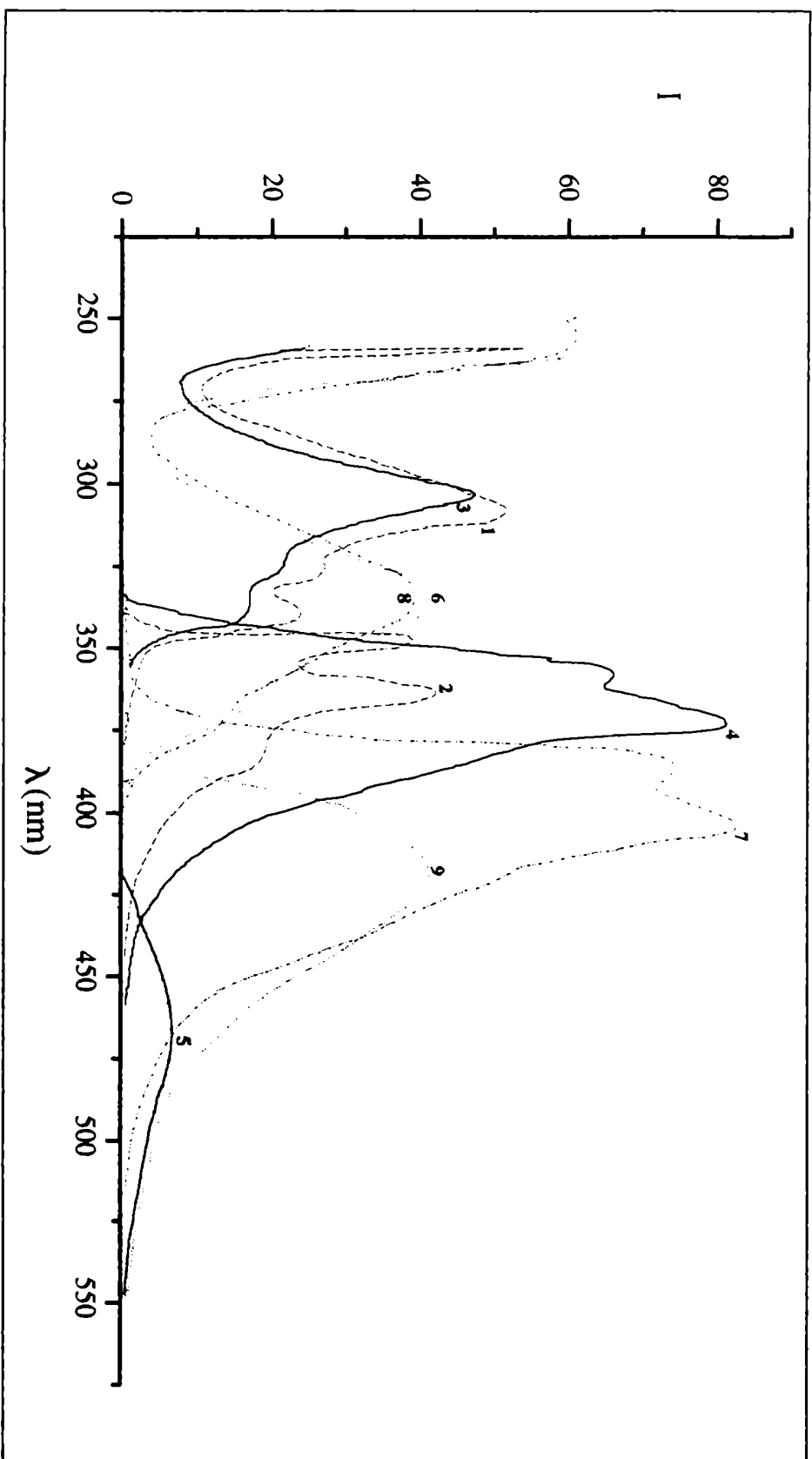


Figura 6B Espectros de excitación y emisión fluorescentes del **harmol** en EtOH absoluto a 77 K (- - - - - λ_{em} : 420 nm **1**, λ_{exc} : 280 nm **2**) y 298 K (— λ_{em} : 420 nm **3**, λ_{exc} : 300 nm **4**, — — — λ_{em} : 400 nm **5**), y en EtOH + 1% H_2SO_4 0,5 M a 77 K (- · - · - λ_{em} : 480 nm **6**, λ_{exc} : 300 nm **7**) y 298 K (····· λ_{em} : 480 nm **8**, λ_{exc} : 300 nm **9**).

Tabla 5. Espectros electrónicos de emisión y de excitación fluorescente y fosforecente de **harmina** y **harmol** en solución etanólica a 298 K y a 77 K(a)

Solvente	Temperatura	Emisión			Excitación		
		$\lambda_{exc}(b)$	$\lambda_{m\acute{a}x}$	I(c)	λ_{em}	$\lambda_{m\acute{a}x}$	1
<u>Harmina</u>(d)							
<i>Fluorescencia</i>							
EtOH 96%	298 K	300	355	630	380	300	500
			367	730		324	310
		330	355	230		336	290
			367	260	420	299	66
						324	34
						336	30
	77 K	300	350	41	380	302	370
			363	55		324	340
		330	363	18		336	150
					420	-	-
<i>Fosforescencia</i>							
EtOH 96%	77 K	300	415(h)	48	435	304	14
			435	70		336	6
		330	415	15	420		
			435	23			
<u>Harmol</u>(e)							
<i>Fluorescencia</i>							
EtOH 96%	298 K	300	352	770	380	302	450
			366	950		326	210
		330	352	300	420	338	170
			366	370		303	100
		380	420	5	480	326	70
			400	-		-	338
						370	15
						303	10
						328	10
						370	3

Tabla 5 Continuación

Tabla 5. Continuación.							
	77 K	280	350	380	400	308	370
			365	430		328	340
			383	210		340	310
		330	365	770	420	310	150
			383	550		330	180
			405(h)	330		340(h)	175
		370	404	68		370	50
		400	-	-	480	330	10
						370	4
		<i>Fosforescencia</i>					
	77 K	310	422	195	430	308	205
			434	215		330(h)	115
			450	235		340	95
		330	423	95	480	310	125
			435	100		330(h)	90
			453	115		340	80
		370	474	10		375	10
			494(h)	8			
	<i>Fluorescencia</i>						
	EtOH absoluto	298 K	280	351	215	380	302
			365	260		325(h)	200
300			351	620		338	170
			365	880	420	302	82
330			351	285		325(h)	38
			365	350		338	30
380			462	1	480	302	5
400			470	2		325	3
					338	3	
					400	1,5	
77 K		280	350	420	380	> 990	
			365	460	400	306	350
			382(h)	210		328	190
		300		> 990		340	170
		330	365	410	420	306	105
		383	420		328	55	
	380	-	-		338	48	
	400	483	2	460	306	11	
					328	7	
					338	6	
					390	1	
				480	306	5	

Tabla 5 Continuación

EtOH + AS(f)						328	3
						340	3
						390	2
		<i>Fosforescencia</i>					
	77 K	300	422	95	430	308	110
			434	110		330(h)	70
			450	120		342	55
		330	422	46			
			434	50			
			450	56			
		370	-	-			
		<i>Fluorescencia</i>					
	298 K	280	415	79	380	246	170
		300	416	220		330	100
		330	415	930	420	250	> 990
		380	416	35		330	950
		400	415	5	480	246	290
						330	180
	77 K	280	384	100	430	242	> 990
			404	115		334	900
		300	384	400		365(h)	350
			402	440	480	334	78
		360	384	630		365(h)	32
			403	690			
		380	410	70			
		400	-	-			
		<i>Fosforescencia</i>					
	77 K	310	474	64	430	-	-
			495(h)	52	480	252	240
		330	474	130		264	220
			495(h)	100		336	170
		370	473	35		370(h)	75
			495(h)	30			

(a) en celdas redondas: celdas de cuarzo Perkin Elmer de 2 mm de diámetro interno; (b) λ en nm; (c) I, intensidad relativa de emisión; (d) concentración: $4,7 \times 10^{-5}$ M, (e) concentración: $5,0 \times 10^{-5}$ M; (f) con 1% de ácido sulfúrico 0,5 M.

Matrices de sílica gel, celulosa y muestra en polvo

Los espectros realizados con la muestra en estado sólido (muestra en polvo) utilizando la técnica de luminiscencia frontal, así como los realizados sobre la muestra adsorbida en placas de sílica gel, utilizando la misma técnica, se describen en la Tabla 6.

Si bien estas técnicas no son de uso habitual, en este caso pudieron registrarse los espectros y obtenerse datos reproducibles y confiables debido a la alta eficiencia de emisión fluorescente que caracteriza a las β -carbolidinas^{9,15,17,29,30,31}.

Uno de los pocos estudios llevados a cabo usando estas técnicas es el realizado por Tomas Vert y col¹². Estos autores registraron algunos espectros de β -carbolidinas aromáticas adsorbidas sobre papel observando tanto la fluorescencia como la fosforescencia originada sólo por la especie catiónica, concluyendo que la especie no cargada no se adsorbía como tal o bien simplemente no emitía luz. Los espectros descriptos son de muy pobre resolución y los autores no hicieron la asignación de las bandas observadas. Sólo en el caso del harmol¹³ asignaron las señales correspondientes al catión y al zwitterión. Así, comparando estos datos^{12,13} con los obtenidos al realizar los espectros del *nor*-harmano neutro y el de su clorhidrato se pudo asignar la banda centrada a 435 nm (la más al rojo) a la especie zwitteriónica (Figura 7A, espectro 1'). En los espectros de excitación sólo se observó una banda la cual se asignó al zwitterión (Figura 7A, espectro 1), ya que esta señal estaba corrida al rojo respecto de la del catión observada en el caso de usar la matriz de sílica (Figura 7B, espectro 1). La banda de este último observada cuando se usó como soporte sílica aparece a longitud de onda similar a la banda obtenida en solución ácida a 298 K. Además, los estudios de difracción de rayos X³²⁻³⁴ revelaron que tanto el *nor*-harmano como el harmano y la harmina presentan una estructura compleja en la cual cada molécula está unida a otras dos por medio de uniones puente de hidrógeno, formando cadenas espiraladas a lo largo de un eje, observándose 4 moléculas de alcaloide por celda unitaria, siendo las moléculas individuales completamente planas (Figura 8). Es lógico entonces

pensar que al trabajar con el alcaloide sólido (muestra en polvo) la emisión se deba a la especie zwitteriónica que está pre-formada en el medio rígido. Los espectros de fluorescencia del harmano presentaron características similares. En este caso en el espectro de emisión se observó adicionalmente otra señal intensa, aparte de la correspondiente al zwitterión, siendo por comparación asignada la misma a la especie neutra (Figura 7A, espectro 2').

En el caso de la harmina se observó también la banda de la especie zwitteriónica en el espectro de excitación, y en el de emisión la de la especie zwitteriónica y con mayor intensidad relativa, la banda de la especie neutra (Figura 7A, espectro 3').

La asignación de las señales del espectro del harmol resultó ser más complicada debido a que por la presencia del grupo fenólico se tiene un grupo funcional adicional que puede participar en otros equilibrios ácido-base. Así se pueden formar, entre otras, la especie protonada (catión), la neutra, la zwitteriónica (OH desprotonado, N piridínico protonado) y el zwitterión monoanión (OH y NH pirrólico desprotonados, N piridínico protonado). Tanto en los espectros realizados sobre sílica como en los realizados sobre papel se observaron las señales correspondientes a la forma catiónica, mientras que en los espectros realizados sobre la muestra sólida se observaron simultáneamente las señales de las especies neutra, catiónica, zwitteriónica y monoaniónica (Tabla 6).

Los espectros obtenidos al fijar los alcaloides sobre placas de sílica (ver Figura 7B, Tabla 6) fueron similares a los de las correspondientes especies catiónicas. Este hecho no es sorprendente ya que como es sabido la sílica posee propiedades ácidas dada su capacidad de formar puentes de hidrógeno.

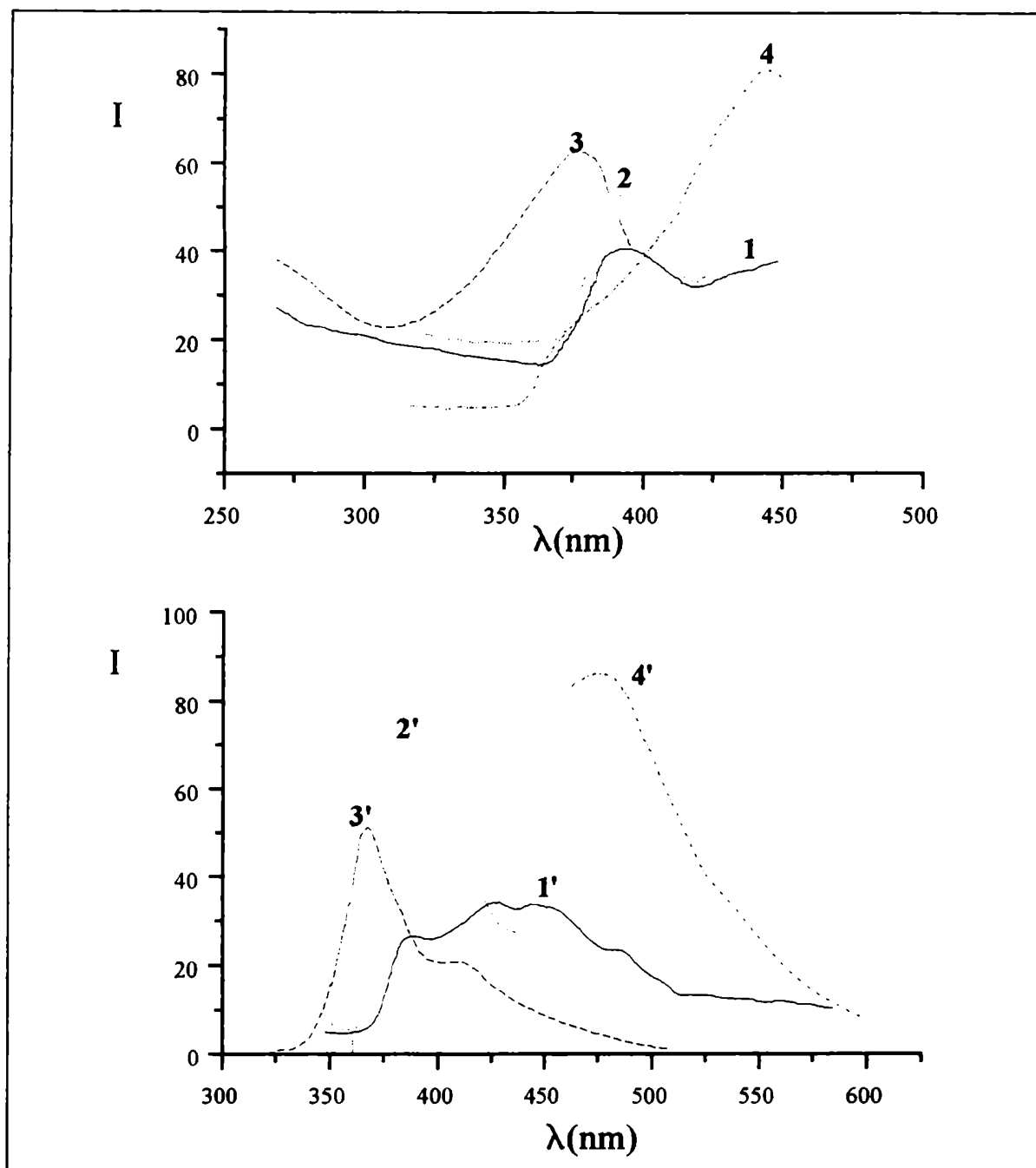


Figura 7A Espectros de excitación fluorescente (arriba) y emisión fluorescente (abajo) de β -carbolinas en polvo: *nor-harmano* (— λ_{em} : 500 nm 1, λ_{exc} : 300 nm 1'); *harmano* (..... λ_{em} : 450 nm 2, λ_{exc} : 350 nm 2'); *harmina* (—— λ_{em} : 440 nm 3, λ_{exc} : 300 nm 3'); *harmol* (— · — · λ_{em} : 500 nm 4, λ_{exc} : 430 nm 4'); T: 298 K.

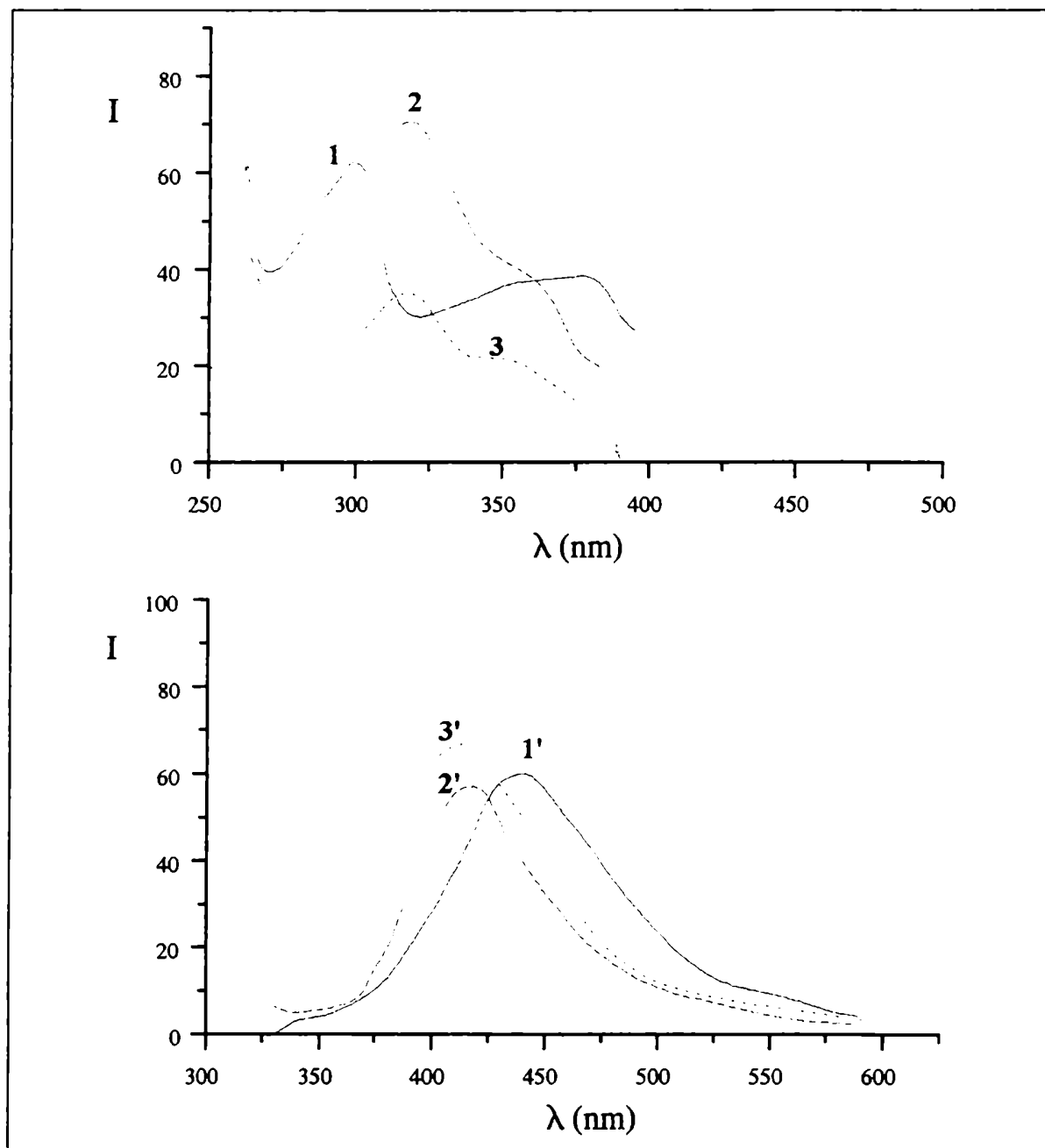


Figura 7B Espectros de excitación fluorescente (arriba) y emisión fluorescente (abajo) de β -carbolinas adsorbidas sobre sílica: *nor-harmano* (— λ_{em} : 420 nm 1, λ_{exc} : 320 nm 1'); *harmina* (----- λ_{em} : 410 nm 2, λ_{exc} : 300 nm 2'); *harmol* (- · - · λ_{em} : 410 nm 3, λ_{exc} : 330 nm 3'); T: 298 K.

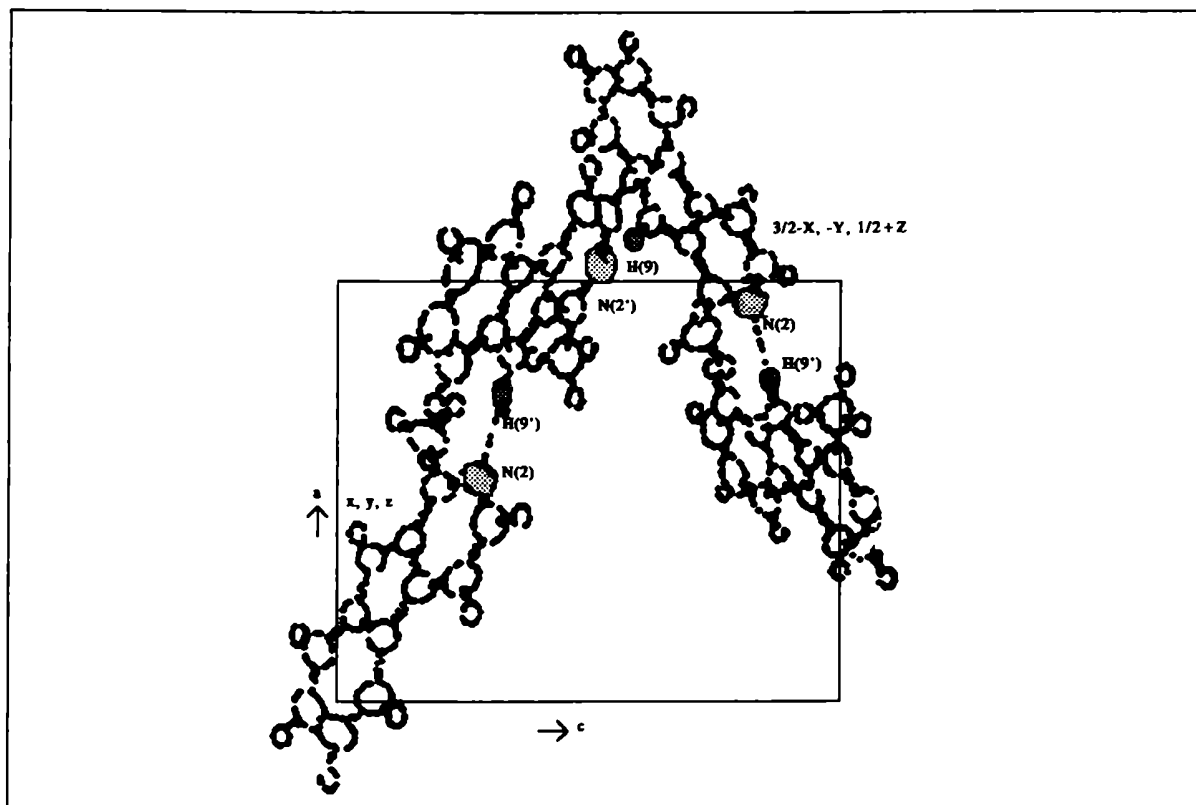


Figura 8. Estructura del harmano obtenida por cirstalografia de Rayos X. Dibujo ORTEP normal al plano ac . Los átomos de C y N dibujados como 50% elipsoides, los de H como esferas. Dibujo copiado de la referencia 34.

Tabla 6 Espectros electrónicos de emisión y de excitación fluorescentes de **β -carbolinas aromáticas** en estado sólido a 298 K.

	Emisión			Excitación		
	$\lambda_{exc}(a)$	$\lambda_{m\acute{a}x}$	I(b)	λ_{em}	$\lambda_{m\acute{a}x}$	I
<u>nor-Harmano</u>						
en polvo	260	445	55	380	-	-
	286	450	25	450	395	16
	300	435	28	500	395	23
adsorbido sobre sílica gel(c)	286	434	900	420	290(h)	460
	320	431	250		302	530
					350(h)	310
					376	330
				520	302	140
					350	90
					378	100
<u>Harmano</u>						
en polvo	300	390	45	390	-	-
		406	38	450	390	41
		460(h)	19	510	392	23
		485	14			
	330	390	56			
		406	48			
		460(h)	48			
		485	13			
	350	391	54			
		406(h)	43			
		460(h)	14			
		485	10			
<u>Harmina</u>						
en polvo	300	365	400	380	-	-
		455	70	420	384	480
	330	364	450	440	381	730
		455	75			
	380	455	800			
adsorbido sobre sílica gel(c)	300	410	550	410	295	700
					355(h)	420

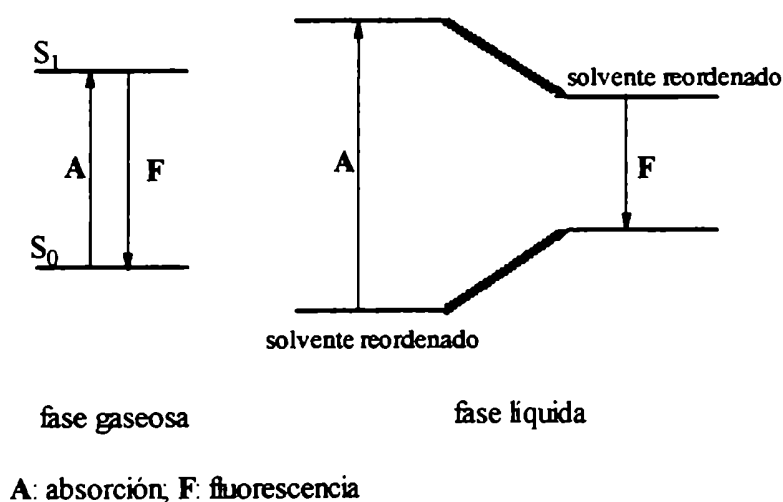
Tabla 6 Continuación

clorhidrato en polvo	300	422	83	550	390	70
		450	86		415	40
	330	422	77			
		450	83			
	380	422	91			
		450	93			
	420	475	36			
<u>Harmol</u>						
en polvo	270	428	120	500	445	170
		450	156	550	444	63
		462	164			
		486	174			
	300	428	90			
		448	96			
		460	106			
		484	106			
	340	428	74			
		450	88			
		462	90			
		486	100			
adsorbido sobre sílica-gel(c)	280	408	43	420	244	135
	300	408	74		325	115
	330	413	100		360(h)	88
	380	414	47	500	325	15
	400	-	-			
adsorbido sobre papel(d)	280	406	3	410	250	23
	300	409	7		330	16
	330	410	7	450	250	10
	370	410	16		330	6
clorhidrato en polvo	280	463	200	380	-	-
	300	468	190	480	393	235
	340	466	180		430(h)	90
	400	474	230	500	395	200
	440	500	100		430(h)	110
				550	397	75
					440	64

(a) λ en nm; (b) I: intensidad relativa de emisión; (c) placas de sílica gel convenientemente activadas; (d) papel Whatmann n° 41.

1.1.5 Interacción soluto-solvente. Ecuación de Lippert-Mataga

Como la distribución de cargas es significativamente diferente en los estados electrónicos excitado y fundamental, la orientación en equilibrio de la caja de solvente debe ser diferente en los dos estados para mantener al sistema en un mínimo de energía. El tiempo corto transcurrido entre que un fotón es absorbido y la molécula excitada, hace imposible la reorientación de la caja de solvente durante el mismo. El cromóforo entonces llega a un estado de Franck Condon de mayor energía que el estado electrónico excitado bien solvatado. La energía de la banda de absorción 0-0 corresponde entonces a la suma algebraica de la transición 0-0 observada en la fase gaseosa, la estabilización del estado fundamental por el solvente y la desestabilización del estado excitado por el solvente. Como la vida media del estado de Franck Condon es más corta que la del estado electrónico excitado S_1 , la reorientación del solvente ocurre antes de la emisión fluorescente. Esta emisión alcanza un estado fundamental de Franck Condon. Como resultado final la emisión fluorescente siempre ocurre a longitudes de onda mayores que la absorción³⁵. Este fenómeno se conoce como corrimiento de Stokes y se puede resumir en el siguiente esquema:



Es sabido que el solvente modifica la energía de emisión y absorción. Se han descrito numerosas expresiones en las que se trata de relacionar alguna propiedad del solvente con la modificación observada en el espectro de emisión²⁸. En la aproximación más simple se puede dividir a los efectos ejercidos por el solvente en generales y específicos. Estos últimos se refieren a una interacción específica entre el soluto y el solvente (formación de un complejo de transferencia de carga, formación de puentes de hidrógeno, etc.). Los primeros resultan de la modificación del índice de refracción y de la constante dieléctrica del solvente. De las numerosas expresiones que existen, utilizaremos una de las más conocidas denominada ecuación de Lippert-Mataga³⁶. En ella se relacionan la diferencia entre las frecuencias máximas de absorción y emisión fluorescente ($\Delta\nu = \nu_a - \nu_f$) con la diferencia de los momentos dipolares en los estados electrónicos fundamental y excitado ($\Delta\mu = \mu^* - \mu$) y el índice de refracción (n) y la constante dieléctrica del solvente (D) según:

$$\Delta\nu = (2 \Delta\mu / hca^3) (\Delta f) + \text{cte.} \quad [1]$$

donde h es la constante de Planck, c es la velocidad de la luz, a es el radio de la cavidad donde se encuentra el fluoróforo y Δf se denomina factor de polarizabilidad de Lippert-Mataga y es igual a $\Delta f = (D - 1) / (2D + 1) - (n^2 - 1) / (2n^2 + 1)$

En la Figura 9 se muestran los resultados obtenidos al graficar los $\Delta\nu$ calculados para las β -carbolinas aromáticas en función de Δf de los solventes utilizados en las Tablas 1 a4. No se observó un comportamiento lineal. Este resultado sería un indicio de que existe algún tipo de interacción específica entre el solvente y la β -carbolina²⁸. A su vez los bajos valores de $\Delta\nu$ obtenidos indican que no existiría una gran distorsión de la geometría molecular en el estado electrónico excitado respecto de la del estado fundamental.

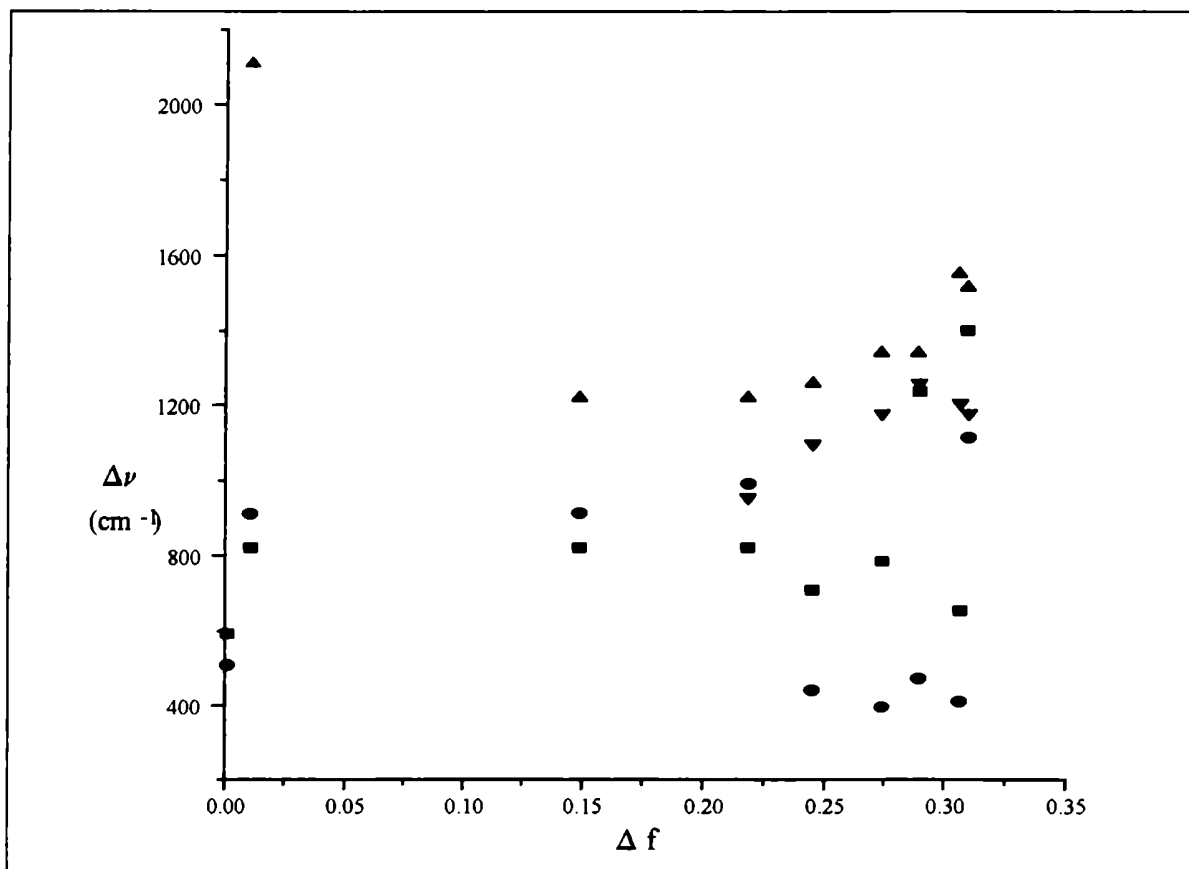


Figura 9 Corrimiento de Stokes $\Delta\nu$ en función del factor de polarizabilidad Δf para (■) *nor*-harmano, (●) harmano, (▲) harmina y (▼) harmol.

1.1.6 Efecto de solvatación preferencial por los alcoholes en solventes no polares

Considerando que los gráficos de Lippert (ver Figura 9) se apartaban de la linealidad indicando que podría haber un tipo de interacción específica entre las β -carbolinas y el solvente, se decidió investigar si existía alguna interacción de este tipo entre las β -carbolinas y los alcoholes en un medio orgánico desprovisto del grupo hidroxilo. Así, al estudiar la influencia del agregado de alcoholes en el espectro de absorción de las β -carbolinas disueltas en solventes no polares tales como el ciclohexano y el isopentano, se observó que la frecuencia mínima de absorción era la misma en los espectros realizados en soluciones de alcohol puro que en los realizados en soluciones de solventes no polares con pequeños agregados de alcohol (fracción molar de ROH = 0,01).

La variación de la frecuencia mínima de absorción (ν) con la variación de la composición de la mezcla de solventes, como toda propiedad intensiva, se relaciona según la siguiente ecuación³⁷

$$\nu_m = \nu_A y_A + \nu_B y_B$$

donde ν_m , ν_A y ν_B son las frecuencias mínimas de absorción en la mezcla, en el solvente A y en el solvente B, respectivamente; y_A y y_B son las fracciones molares de los solventes A y B en la esfera de solvatación.

Los valores de y_A y y_B coinciden con los del seno de la solución si no existen interacciones específicas entre uno de los solventes de la mezcla y el soluto.

En nuestro caso la ν_m resulta ser igual a la ν_{ROH} , pese a tratarse de soluciones en las que la fracción molar de ROH en el seno de las mismas es menor que 0,01. Esto indica que estamos frente a un caso de solvatación preferencial. El modelo de Stengle³⁸, que intenta describir los procesos termodinámicos involucrados en este fenómeno, predice una relación simple entre la composición del seno del solvente y la composición de la esfera de solvatación de la forma $y_A/y_B = K (Y_A/Y_B)$, donde y_A y y_B son las fracciones molares de los solventes A y B en la esfera de solvatación e Y_A y Y_B son las fracciones molares en el seno

de la solución. En este caso no pudo estimarse un valor de K ya que como la esfera de solvatación está casi exclusivamente compuesta por un componente, un pequeño error en la determinación de la concentración de éste lleva a un error grande en la determinación del minoritario.

El origen de esta solvatación preferencial podría deberse a la formación a través de uniones tipo puente de hidrógeno de un complejo entre la molécula de β -carbolina y la/s molécula/s de alcohol. Esta hipótesis se ve avalada por el hecho que cuando se estudiaron los espectros de absorción del *nor*-harmano y del harmano en ciclohexano y en isopentano con el agregado de distintos alcoholes (etanol y 1-butanol) se observó la presencia de puntos isobésticos, como se muestra con un ejemplo de cada β -carbolina en las Figuras 10A y 10B. La presencia de puntos isobésticos indica que los cambios observados en estos espectros no se deberían meramente a un efecto de polaridad de solvente sino que se deben a la formación de una nueva especie.

Para determinar la estequiometría de el/los complejos formado/s se planteó el equilibrio general



donde $B = \beta$ -carbolina y $R = ROH$

Trabajando en soluciones suficientemente diluidas la constante de asociación se define:

$$K = [BR_n]/[B][R]^n$$

si $[B]_0$ es la concentración inicial de B , $[R]_0$ es la concentración inicial de R , $[BR_n]$ es la concentración del complejo, entonces

$$K = [BR_n] / ([B]_0 - [BR_n])([R]_0 - [BR_n])^n \quad [3]$$

si $[R]_0 \gg [B]_0$, entonces $[R]_0 - [BR_n] \sim [R]_0$

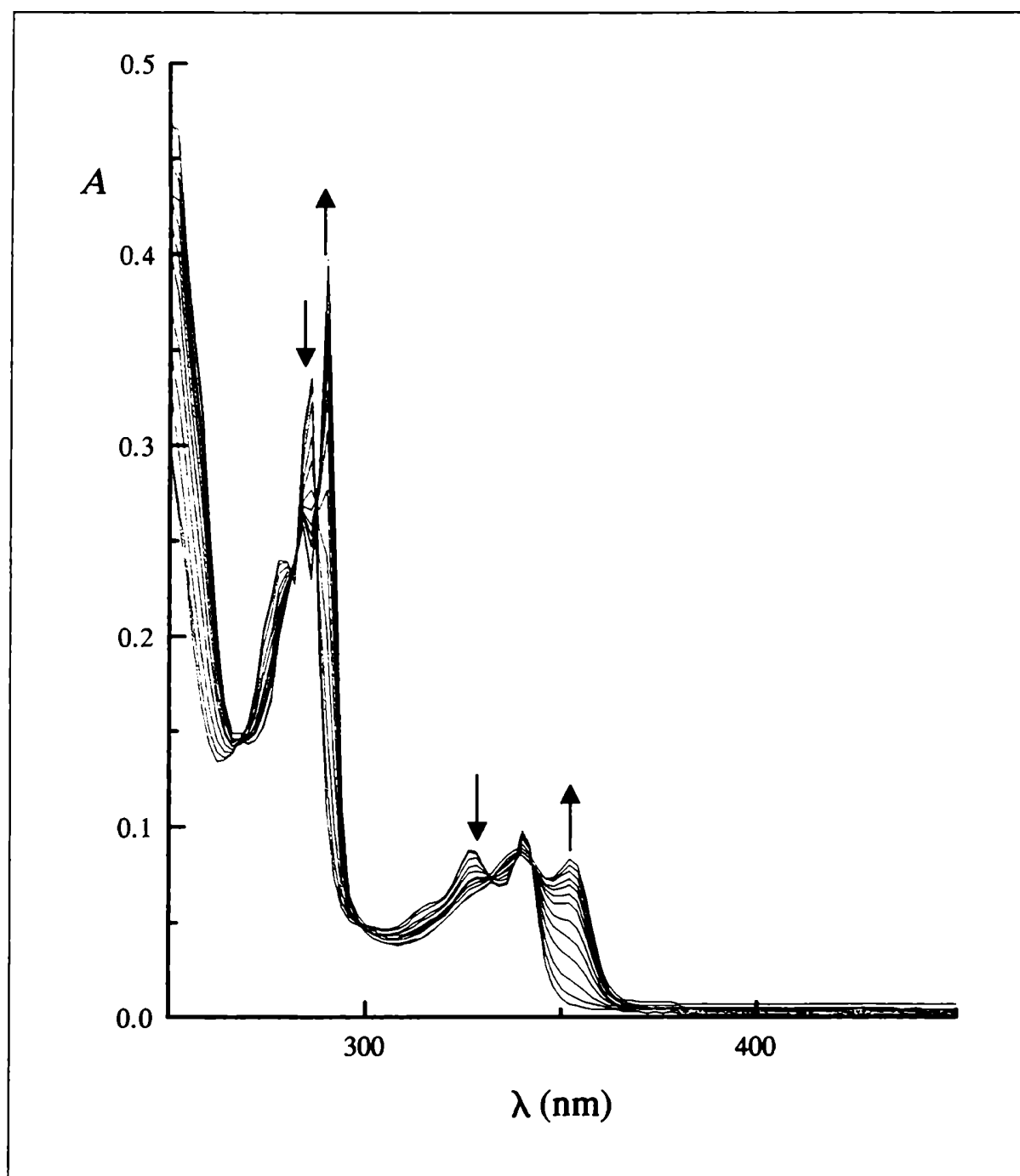


Figura 10A Espectros de absorción del *nor-harmano* en ciclohexano ($c: 2,0 \times 10^{-5}$ M) con agregados crecientes de EtOH. [EtOH]: 0; 0,006; 0,011; 0,017; 0,023; 0,028; 0,034; 0,040; 0,045; 0,051; 0,060; 0,085; 0,114 M.

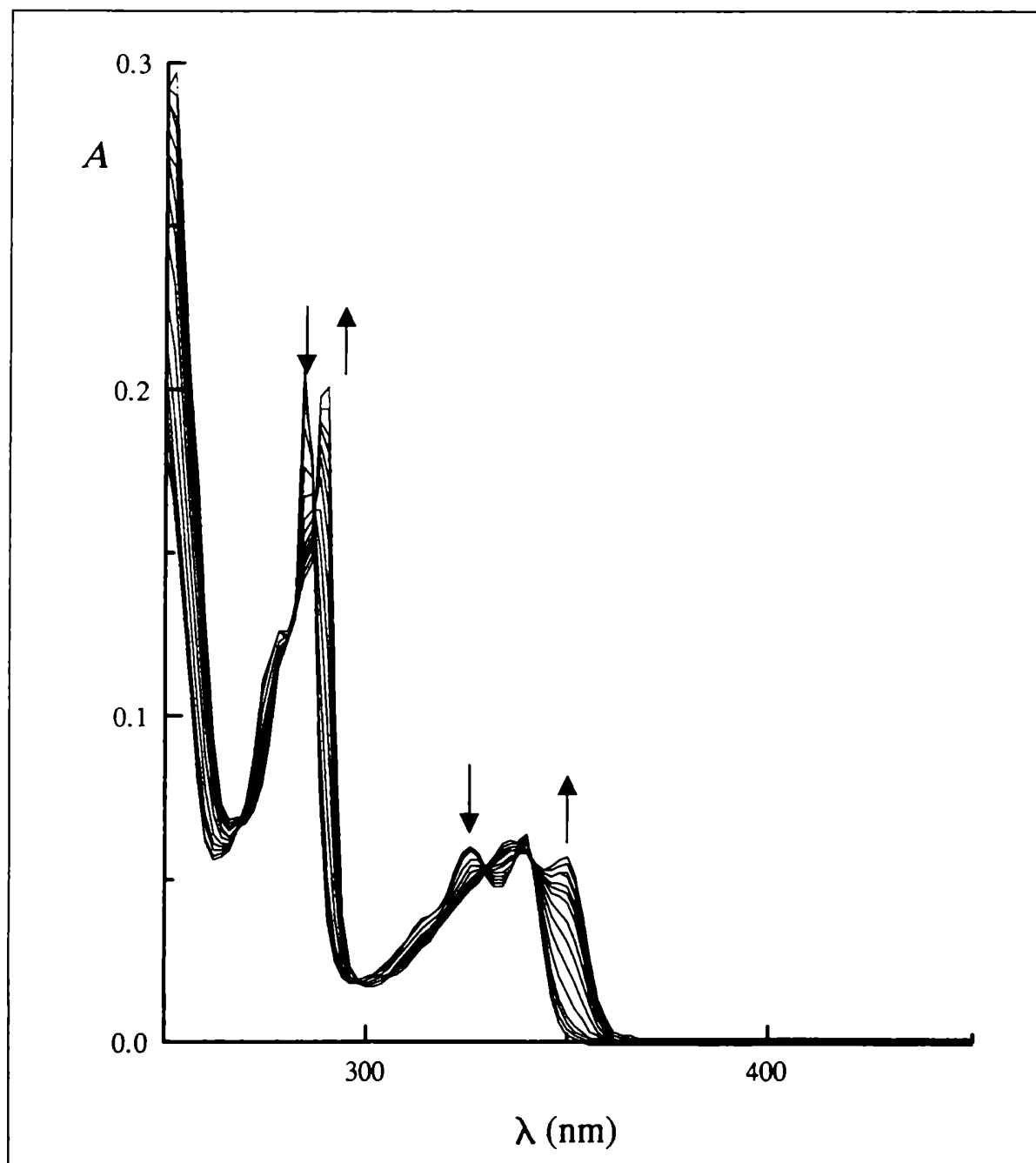


Figura 10B Espectros de absorción de **harmano** en ciclohexano ($c: 1,0 \times 10^{-5}$ M) con agregados crecientes de EtOH. [EtOH]: 0; 0,006; 0,011; 0,017; 0,028; 0,040; 0,051; 0,062; 0,074; 0,085; 0,097; 0,108; 0,119; 0,142; 0,170; 0,227 M.

Si la absorbancia de la solución se mide a una longitud de onda tal que la única especie que absorbe es el complejo BR_n , ésta será: $A = \epsilon l [BR_n]$, donde ϵ es el coeficiente de absorción molar del complejo a esa longitud de onda. Reemplazando en la ecuación:

$$K = A / ([B]_0 \epsilon - A) [R]_0^n \quad [4]$$

reordenando $[R]^n / A = 1/K [B]_0 \epsilon l + [R]^n / [B]_0 \epsilon l \quad [5]$

aplicando logaritmos: $\ln ([B]_0 \epsilon / A - 1) = -\ln K - n \ln [R] \quad [6]$

Los valores obtenidos en las distintas experiencias se presentan en la Tabla 7.

Tabla 7 Valores de $n^{(a)}$ obtenidos para *nor*-harmano y harmano luego de realizar una regresión lineal

β -Carbolina	Solvente	ROH	n	$r^2(b)$
<i>nor</i> -Harmano	Ciclohexano	EtOH	2,07	0,992
	Ciclohexano	n-BuOH	2,15	0,995
	Isopentano	n-BuOH	2,6	0,987
Harmano	Ciclohexano	EtOH	2,05	0,993
	Ciclohexano	n-BuOH	1,92	0,996
	Isopentano	n-BuOH	1,33	0,990

(a) a partir de la ecuación [6], λ de monitoreo: *nor*-harmano: 356 nm, harmano: 352 nm;

(b) factor de correlación.

El valor de ϵ obtenido luego de aplicar la ecuación [5] coincide con el obtenido directamente del espectro de absorción, como se puede ver en la Tabla 8a.

Tabla 8a Valores de K y ε obtenidos a partir de la ecuación [5](a) luego de realizar una regresión lineal.

β -carbolina	Solvente	ROH	K	ε calculado(b) ($M^{-1} \text{ cm}^{-1}$)	ε medido(c) ($M^{-1} \text{ cm}^{-1}$)	r^2 (d)
<i>nor</i> -Harmano	Ciclohexano	EtOH	2074	3381	3280	0,997
	Ciclohexano	n-BuOH	1372	3382	3284	0,999
	Isopentano	n-BuOH	2004	5331	5044	0,985
Harmano	Ciclohexano	EtOH	325	5709	5460	0,998
	Ciclohexano	n-BuOH	355	5206	5062	0,999
	Isopentano	n-BuOH	217	5943	5293	0,992

(a) λ de monitoreo: *nor*-harmano: 356 nm, harmano: 352 nm; (b) valores obtenidos a partir de la ecuación [5]; (c) valores obtenidos a partir de la A en soluciones donde B se encuentra totalmente como BR_n (error ± 100); (d) factor de correlación.

Otra forma de calcular la K de asociación es hacer uso del espectro completo de las especies en equilibrio con programas de procesamiento adecuados basados en técnicas quimiométricas (análisis factorial). Los fundamentos de la técnica utilizada se describen en la Parte Experimental E.13. Dicha técnica permite hacer una regresión no lineal por cuadrados mínimos de los datos obtenidos. De esta forma se obtienen tanto los valores de ε del complejo como de la especie no complejada en todo un rango de longitudes de onda, no limitado a la zona donde sólo absorbe una de las especies en cuestión. Aplicando estas técnicas a los casos antes descriptos, se obtuvieron los valores que se muestran en la Tabla 8b.

Tabla 8b Comparación de los valores de K de asociación obtenidos a partir de la ecuación [5] y obtenidos a partir del análisis factorial

β -Carbolina	Solvente	ROH	K(a)	r^2 (b)	K(c)	dif.(d)
<i>nor</i> -Harmano	Ciclohexano	EtOH	2074	0,997	1528	0,0011
	Ciclohexano	n-BuOH	1372	0,999	1733	0,0046
	Isopentano	n-BuOH	2004	0,985		
Harmano	Ciclohexano	EtOH	325	0,998	376	0,0010
	Ciclohexano	n-BuOH	355	0,999	436	0,0097
	Isopentano	n-BuOH	217	0,992	361	0,0078

(a) valores obtenidos a partir de la ecuación [5] λ de monitoreo: *nor*-harmano: 356 nm, harmano: 352 nm; (b) factor de correlación; (c) valores obtenidos a partir del análisis factorial; (d) dif.: suma residual de cuadrados.

Como ya señalamos una de las ventajas de este método respecto del de Foster³⁹ (ecuación [5]) es que se trabaja en un rango de longitudes de onda, no importando que se superpongan en el mismo los espectros de las especies involucradas. Otra de las ventajas es que permite predecir los espectros de ambas especies, no siendo necesario tener *a priori* el espectro aislado de las mismas. En este caso el rango de longitudes de onda analizado es 280 a 360 nm, y podemos obtener tanto el espectro de B (β -carbolina en ciclohexano sin ROH) como el de la especie BR₂ (β -carbolina en ciclohexano con fracción molar de ROH > 0,01). Como se puede ver en la Figura 11 los espectros predichos por este

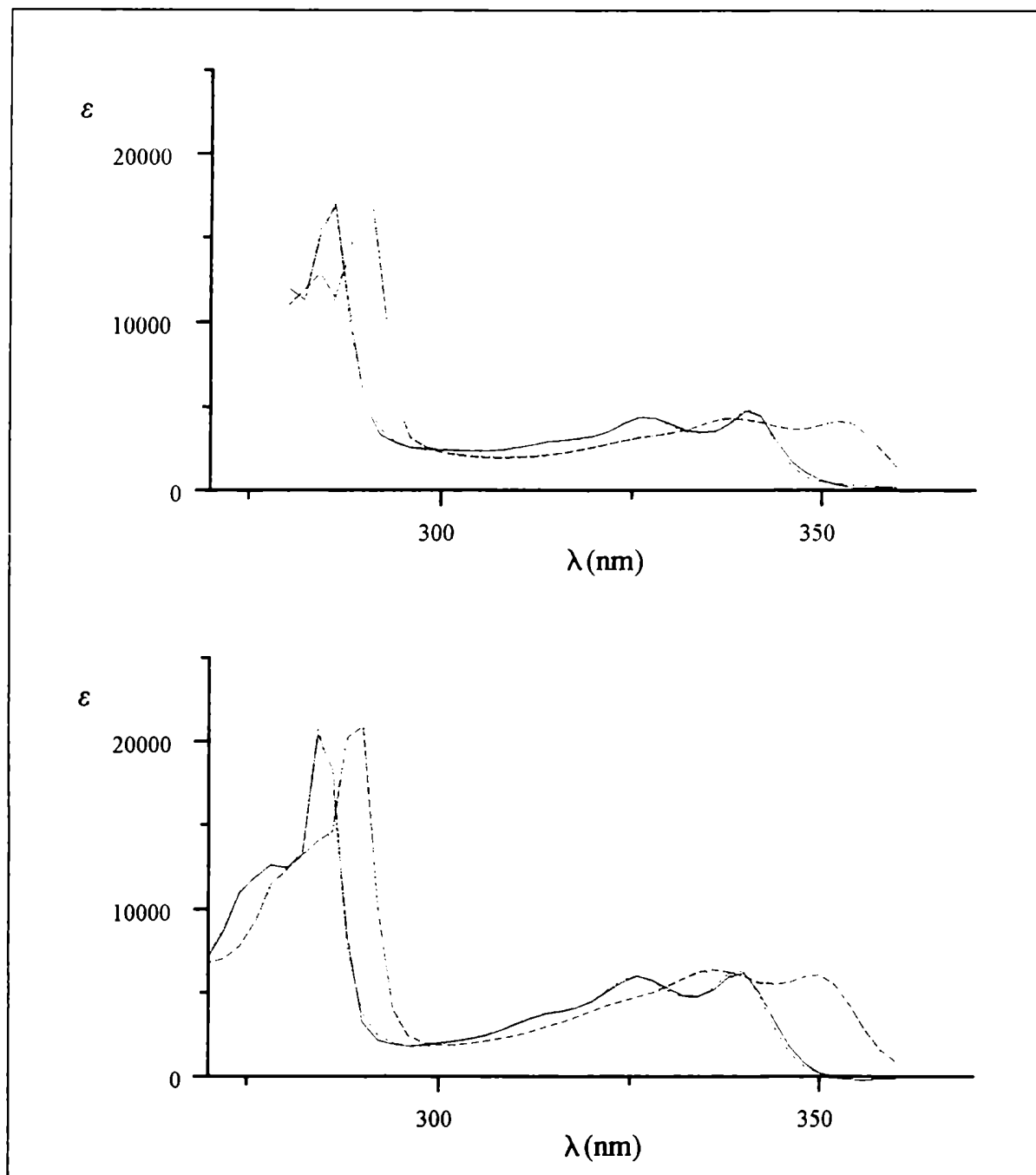


Figura 11. Espectro de absorción de *nor-harmaline* (arriba) y *harmaline* (abajo): B real (— · — · —); B calculado (—); BR₂ real (-----); BR₂ calculado (.....); B y BR₂ definidos en el texto.

tratamiento para las especies B y BR_2 coinciden con los obtenidos experimentalmente para las mismas.

Cabe señalar que la formación del complejo es reversible. Si a una solución con una concentración dada de alcohol se la diluye a la mitad con el solvente no polar correspondiente, la forma del espectro de absorción es similar a la del espectro de una solución con una concentración de alcohol igual a la mitad de la primera solución, observándose claramente el desplazamiento del equilibrio.

Este tipo de complejos que se forman entre moléculas con grupos ácidos y básicos en su estructura con alcoholes ya ha sido descrito en la literatura. Se ha estudiado la formación de complejos de tipo 1:1 con doble puente de hidrógeno entre el 7-azaindol y el etanol, obteniéndose resultados similares con otros alcoholes^{40,41}. A partir de los espectros de absorción, usando la ecuación de Benesi-Hildebrand⁴², modificada por Scott⁴³ se calcularon los valores de la constante de formación de estos complejos. También en los espectros de emisión fluorescente se observó una nueva señal corrida hacia el rojo la que correspondería a la emisión del tautómero formado en el estado excitado, de características similares a la observada a partir del dímero del 7-azaindol.

Resultados similares fueron los obtenidos por Waluk y col⁴⁴ al estudiar las α -carbolinas, para las cuales detectaron la presencia de complejos de tipo α -carbolina:ROH 1:1 y 1:2. Determinaron además, que uno solo de éstos, el complejo 1:1, es capaz de participar de una doble transferencia de protón en el estado electrónico excitado. Concluyeron entonces que la energía de activación para el proceso de transferencia de protón sería mucho más baja en este tipo de complejo que en los de tipo 1:2

La falta de una nueva señal corrida hacia el rojo en el espectro de emisión en el caso de las β -carbolinas podría explicarse teniendo en cuenta los resultados anteriores (Tabla 7) ya que estas moléculas sólo formarían complejos con los alcoholes del tipo 1:2. En este tipo de complejos la doble transferencia de protón no ocurriría en el estado electrónico excitado con la suficiente eficiencia como para formar el tautómero fluorescente.

Además, en el caso de las β -carbolinas la formación del complejo tipo 1:1 con doble puente de hidrógeno estaría impedida por razones de tipo geométricas, como surge de la comparación de éste con el correspondiente complejo 1:1 de la α -carbolina (ver Figura 12).

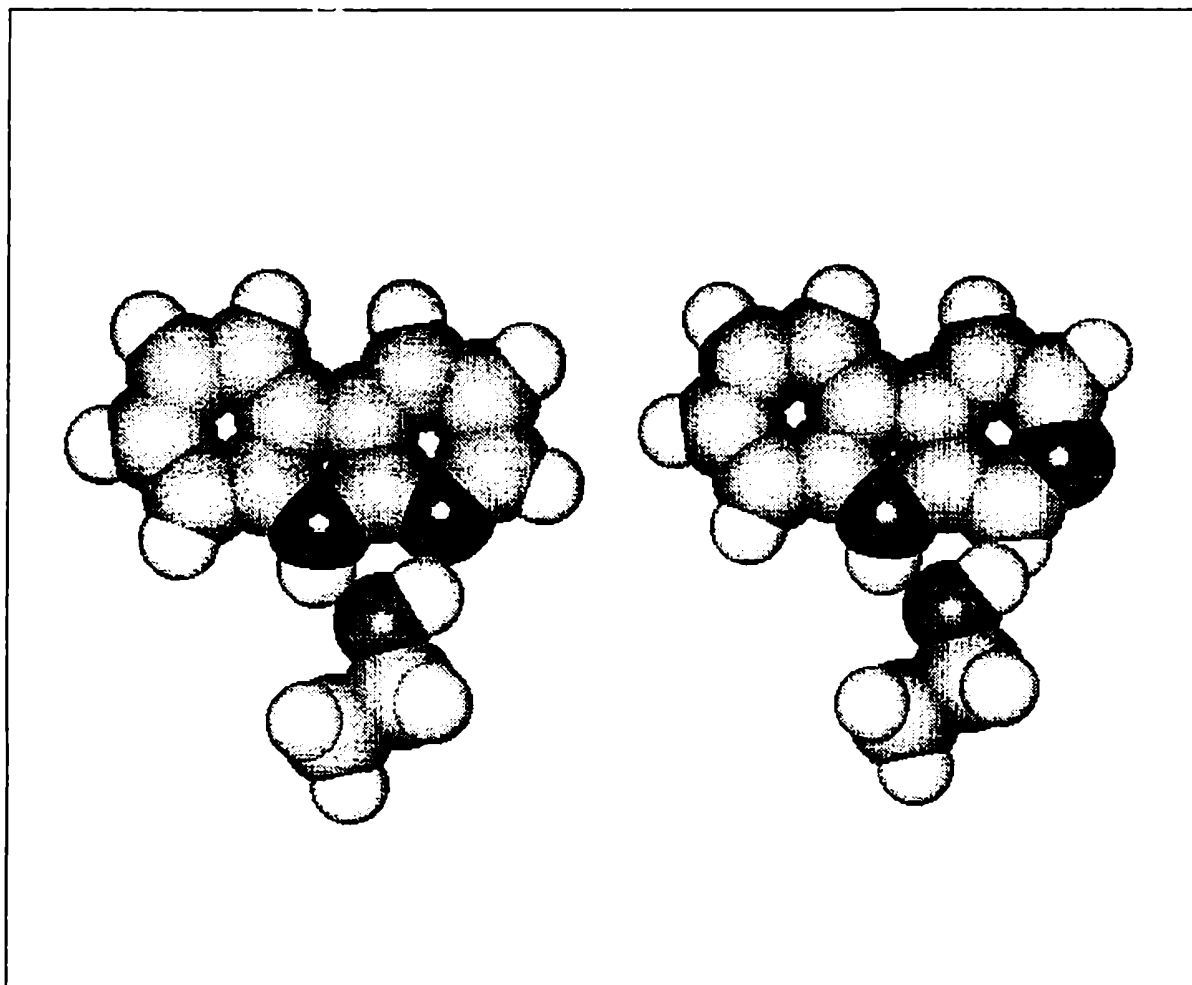


Figura 12 Complejo carbolina-EtOH 1:1: a la izquierda α -carbolina, a la derecha β -carbolina. Geometrías optimizadas por PM3 (Hyper Chem Release 4.5-Chem Plus⁴⁵).

También se calculó la K de formación del complejo a partir de datos de intensidad de emisión fluorescente (I). Considerando que se trabajó con una λ_{exc} tal que $A < 0,1$, la I resulta proporcional a la concentración de fluoróforo. Entonces haciendo un tratamiento similar al usado para deducir la ecuación [5] se llega a la ecuación [7]⁴⁶, en la cual también se incluye al factor a que depende del instrumental:

$$[R]^n / I = a / K [B]_0 \varepsilon + a [R]^n / [B]_0 \varepsilon \quad [7]$$

Al realizar los espectros de emisión fluorescente del *nor*-harmano y del harmano en ciclohexano e isopentano con el agregado de distintos alcoholes se obtuvieron espectros que análogamente a los de absorción UV-vis. presentaban puntos isobésticos. En la Figura 13 se muestra como aumenta la I con agregados de etanol al excitar a una λ tal que sólo absorba el complejo en el caso del *nor*-harmano en ciclohexano.

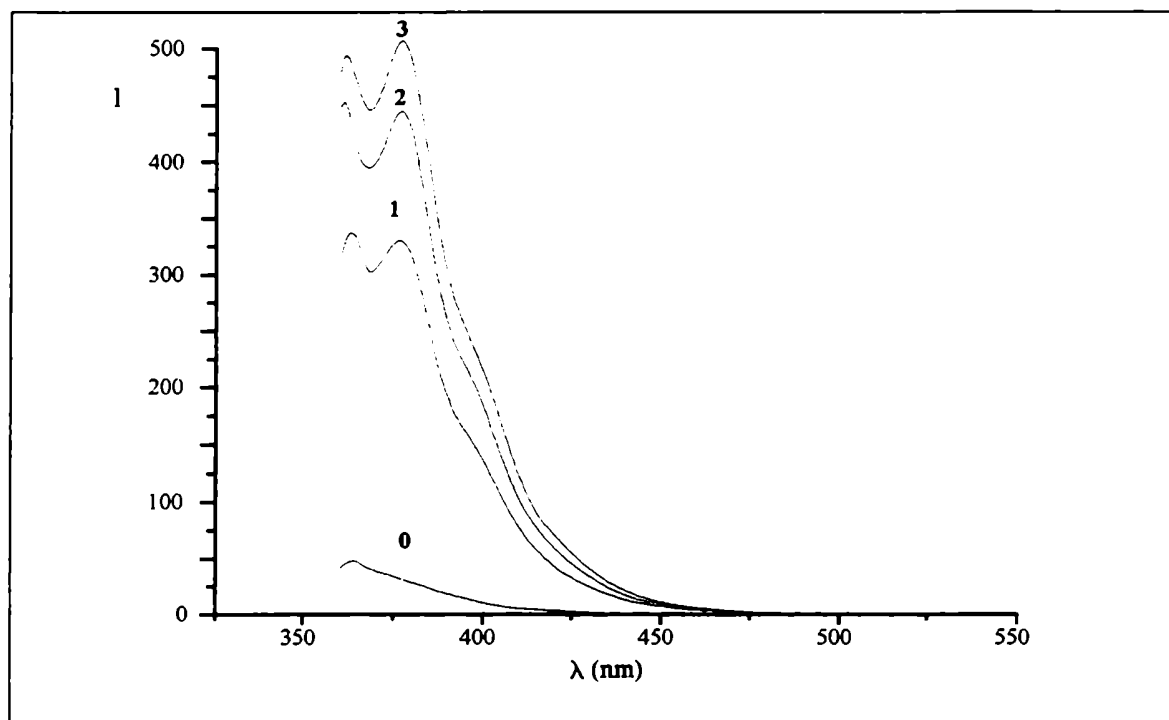


Figura 13 Espectros de emisión fluorescente del *nor*-harmano en ciclohexano con agregados de EtOH. [*nor*-Harmano] = 1×10^{-5} M, λ_{exc} 350 nm, [EtOH] = (0) 0, (1) 0,026, (2) 0,051, (3) 0,085 M

Al usar la ecuación [7], suponiendo $n = 2$, con los datos de intensidad fluorescente obtenidos al realizar los espectros de emisión del *nor*-harmano y del harmano en ciclohexano e isopentano con el agregado de cantidades variables de alcohol se obtuvieron rectas. De esta manera se calcularon entonces los valores de las constantes de formación del complejo 1:2, los que se presentan en la Tabla 9.

Tabla 9 Valores de K obtenidos a partir de la ecuación [7]^(a) luego de realizar una regresión lineal.

β -Carbolina	Solvente	ROH	K	r ² (b)
<i>nor</i> -Harmano	Ciclohexano	EtOH	3748	0,995
	Ciclohexano	n-BuOH	2733	0,995
	Isopentano	n-BuOH	3124	0,999
Harmano	Ciclohexano	EtOH	484	0,990
	Isopentano	n-BuOH	344	0,999

(a) λ_{exc} : 350 nm, λ_{em} : 400 nm; (b) factor de correlación.

Si se comparan los valores de K de formación del complejo 1:2 obtenidos a partir de los datos de absorción (Tabla 8b) con los obtenidos a partir de los datos de emisión, se observa en todos los casos que los últimos son mayores. Esto indicaría que la formación del aducto se ve ligeramente favorecida en el estado excitado, lo que como se verá más adelante está de acuerdo con la mayor capacidad donora de electrones de las β -carbolinas en el estado electrónico excitado S_1 .

1.1.7 Efecto de la concentración en los espectros electrónicos

Existen en la literatura varios estudios sobre la formación de agregados de tipo dímérico entre moléculas que presentan en su estructura simultáneamente un grupo ácido y uno básico. Por ejemplo, se ha descrito la emisión proveniente de dímeros del 7-azaindol en los que se produciría una doble transferencia protónica en el estado excitado dando origen a la formación de un tautómero⁴⁷, observándose este efecto en solventes no polares (Figura 14). La constante de formación de los dímeros en el estado S_0 ha sido calculada haciendo uso de la espectroscopia de absorción UV-vis. Del análisis de los espectros de emisión fluorescente se pudo determinar la presencia de una nueva especie fluorófora, el tautómero, el que no se formaría en el estado fundamental, presentando el mismo un λ_{em} muy corrido hacia el rojo (por ejemplo, en 3-metilpentano, a λ_{exc} 285 nm, resultan ser λ_{em} monómero \sim 300 nm, λ_{em} dímero \sim 310 nm, λ_{em} tautómero \sim 460 nm). Un comportamiento similar se observó para las α -carbolinas⁴⁸, describiéndose también para las mismas una señal fluorescente debida al tautómero muy desplazada hacia al rojo respecto de la del monómero y la del dímero (550, 360 y 384 nm respectivamente).

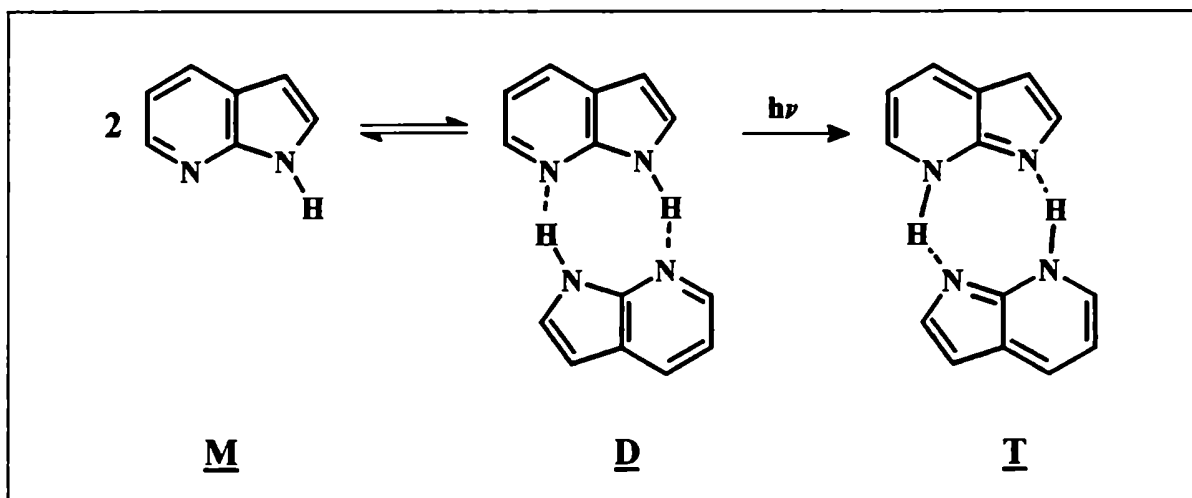


Figura 14 Equilibrio del 7-azaindol y su dímero. Formación del tautómero.

Teniendo en cuenta la información estructural obtenida por espectroscopía de Rayos X³²⁻³⁴, desde el punto de vista teórico podrían formarse distintos tipos de complejos. Unos con estructura helicoidal por la interacción de cada unidad con dos unidades diferentes a través de uniones de los grupos N-H y N con los grupos N y N-H respectivamente de dos moléculas diferentes. Otros de tipo dimérico con estructura sandwich (ubicándose cada unidad de β -carbolina en planos paralelos e interactuando a través de las nubes electrónicas π) o de tipo dimérico cabeza a cola (aprovechando de cada unidad monomérica las propiedades ácido-base del N pirrólico y del N piridinico). En nuestras condiciones experimentales no se pudieron detectar por espectroscopía de absorción UV-vis, excitación y emisión fluorescentes señales que evidencien la formación de complejos o agregados de este tipo. La ausencia de este tipo de estructuras detectables podría deberse: 1) a que la baja solubilidad de la β -carbolinas en solventes no polares como el ciclohexano y el isopentano no permite aumentar significativamente la concentración de la β -carbolina en el medio y de esta manera desplazar el equilibrio de formación de los dímeros en dicho sentido; 2) a que en cualquiera de los dos tipos de dímeros el H del N pirrólico y los electrones del N piridinico no pueden acomodarse de tal forma de quedar a distancia favorable para la formación de un puente de hidrógeno. Este impedimento estérico se pone en evidencia al analizar los resultados que se obtienen al realizar los cálculos de optimización de geometría de los posibles dímeros con el método semiempírico PM3 (Hyper Chem-Release 4.5-Chem Plus⁴⁵).

En el caso de un solvente más polar (etanol), donde sí son suficientemente solubles, se realizaron los espectros de absorción y de emisión y de excitación fluorescentes para el *nor*-harmano, el harmano y la harmina en el rango de concentraciones comprendido entre 10^{-3} y 10^{-6} M. No se observaron en ningún caso señales nuevas. Del análisis de los espectros de absorción en función de la concentración se concluyó que el rango donde se cumple la ley de Beer es el comprendido entre 10^{-6} a 10^{-4} M. Al aumentar la concentración por encima de 4×10^{-5} M se empiezan a observar en los espectros de excitación y emisión fluorescentes los

efectos propios del fenómeno de autoabsorción o filtro interno. Este fenómeno da lugar a la aparición de falsas bandas nuevas, las que se forman a partir de la partición de las originales. Con el objeto de confirmar esta suposición se realizaron los espectros de fluorescencia reduciendo el paso óptico. Para ello se usaron cubetas de 2 mm de paso óptico, haciendo los espectros de emisión y excitación fluorescentes con la técnica frontal, en lugar de la habitual a 90°. Los espectros así obtenidos resultaron similares a los realizados a menor concentración, razón por la cual se descartó la presencia de nuevas unidades electrónicas en el medio.

La falta de señales cuya variación con la concentración pudiera asociarse a la formación de estructuras de tipo dimérico o agregados superiores se debería a la existencia de una interacción específica entre la β -carbolina y el solvente del tipo puente de hidrógeno, la que compita eficazmente con la simple agregación de los monómeros.

1.1.8 *Tiempos de vida de fluorescencia*

En el presente trabajo se ha calculado el tiempo de vida de fluorescencia intrínseco τ_0 , definido como la recíproca de la constante de desactivación por emisión espontánea (k_F) desde un estado de energía superior u para poblar uno de energía inferior l . Esto es el tiempo de vida medio del estado u si el único mecanismo de desactivación fuera la emisión espontánea para alcanzar el estado l . Para este cálculo se utilizó la ecuación de Strickler y Berg⁴⁹.

$$\frac{1}{\tau_0} = 2880 \frac{g_l}{g_u} n^2 \frac{\int F d\bar{\nu}}{\int F \bar{\nu}^{-3} d\bar{\nu}} \int \frac{\epsilon d\bar{\nu}}{\bar{\nu}} \quad [8]$$

donde n es el índice de refracción, ν es el número de onda expresado en cm^{-1} , I es la intensidad de fluorescencia, g_l y g_u son las multiplicidades de los estados de menor y mayor energía respectivamente, y ϵ es el coeficiente de absorción molar.

Los tiempos de vida media de fluorescencia (τ) de las β -carbolinas fueron medidos primero en soluciones acuosas a distintos valores de pH^{8,9,17,30,50}. Así se midieron los tiempos de vida de las especies catiónicas y de las neutras. En general los τ de los cationes resultaron mayores, así como sus eficiencias cuánticas de fluorescencia Φ_f .

A. Pardo, J. Hidalgo y col.^{29,30} midieron los τ y Φ_f de las β -carbolinas aromáticas en solución etanólica y los compararon con los τ_0 calculados utilizando la ecuación de Strickler y Berg, modificada por Birks y Dyson⁵¹. Los valores resultaron similares dentro del error experimental. En un trabajo más reciente Macanita y col.¹⁸ midieron los τ en metanol y Lippitsch y col.⁵⁰ los del *nor*-harmano en tolueno, metanol y acetonitrilo.

Strickler y Berg desarrollaron la fórmula [8] en la cual se relaciona el τ_0 con las intensidades de fluorescencia y de absorción de bandas moleculares de transiciones permitidas. Esta ecuación es válida para una transición singulete-singulete si cumple ésta con dos condiciones: 1) la banda debe ser intensa (ϵ alrededor de 8000) y 2) no debe haber una diferencia de geometría muy grande entre el estado excitado y el estado fundamental. Esto significa que la molécula debe tener la banda de absorción de la transición singulete-singulete de menor energía suficientemente intensa y separada de las otras bandas de absorción de manera tal de poder calcular el área de ésta y además el espectro de emisión fluorescente debe ser imagen especular del de absorción. El tiempo de vida medio real (τ) es menor que el τ_0 si el rendimiento cuántico de fluorescencia es menor que 1. Entonces para poder calcular el τ , el Φ_f debe ser conocido. A modo de ejemplo en la Tabla 10 se muestran algunos resultados descriptos en la literatura obtenidos al usar esta ecuación y a los mismos

se los compara con los τ medidos. Como puede verse los tiempos de vida medidos y calculados coinciden dentro del error experimental.

Tabla 10 Comparación de los tiempos de vida medios de fluorescencia calculados y medidos ⁴⁹

Compuesto	Solvente	τ calculado(a) (ns)	τ medido (ns)
Perileno	Benceno	4,79	4,29
Acridona	EtOH	11,80	12,06
9-Aminoacridina	EtOH	13,87	15,43
9-Aminoacridina	EtOH-HCl	14,07	14,19
9-Aminoacridina	H ₂ O	16,04	16,40
9-Aminoacridina	H ₂ O-HCl	15,45	16,67
Fluoresceína	H ₂ O-NaOH	4,02	4,37
Rodamina B	EtOH	6,16	6,01

(a) calculados a partir de $\tau = \tau_0 \Phi_f$

Como puede verse en la Figura 15 el *nor*-harmeno y el harmeno cumplen con las dos condiciones antes mencionadas tanto en solventes polares como en no polares, siendo posible entonces hacer uso de la ecuación [8]

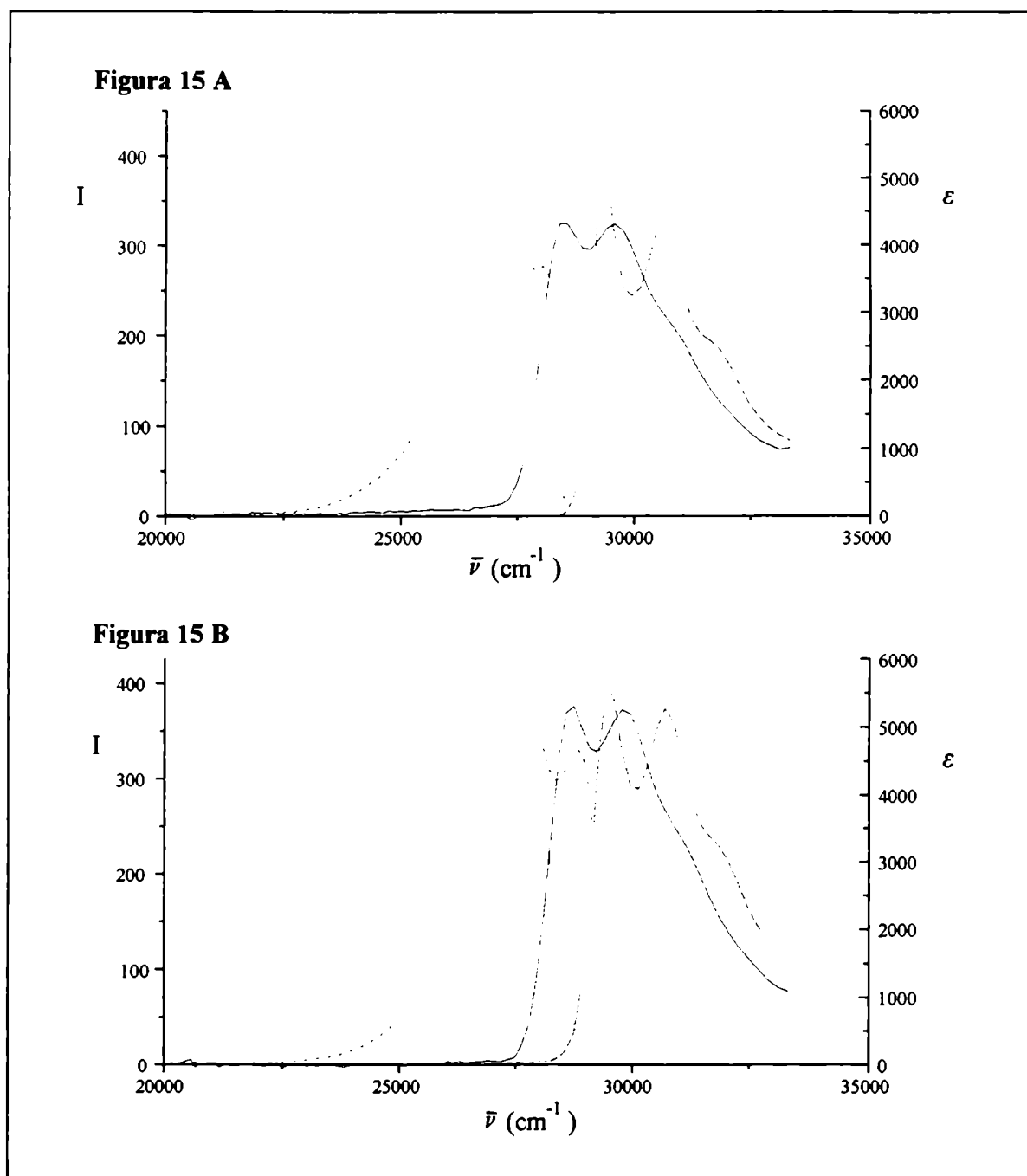


Figura 15 Espectros de absorción y emisión fluorescente. **15A nor-harmano**: absorción: (—) en EtOH, (----) en ciclohexano; emisión $\lambda_{exc} = 336$ nm (.....) en EtOH, $\lambda_{exc} = 330$ nm (-.-.-) en ciclohexano; **15B harmano**: absorción: (—) en EtOH, (----) en ciclohexano; emisión $\lambda_{exc} = 336$ nm (.....) en EtOH, $\lambda_{exc} = 330$ nm (-.-.-) en ciclohexano

Los resultados obtenidos haciendo uso de esta ecuación se presentan en las Tabla 11.

Tabla 11 Valores de los tiempos de vida de fluorescencia intrínseco τ_0 , real τ y Φ_f del *nor*-**harmano** y del **harmano** en solventes orgánicos

β -Carbolina	Solvente	τ_0 calculado(a) (ns)	Φ_f (b)	τ calculado(c) (ns)	τ medido(d) (ns)
<i>nor</i> -Harmano	EtOH	3,6	0,45	1,6	5,1
	i-PrOH	3,9	0,44	1,7	
	t-BuOH	5,3	0,45	2,4	5,1
	n-BuOH	5,7			
	MeCN	4,8	0,15	0,7	
	CH ₂ Cl ₂	3,9	0,14	0,6	2,9
	Ciclohexano	4,1	0,11	0,5	
Harmano	EtOH	3,7	0,36	1,1	4,9
	i-PrOH	2,9	0,35	1,0	
	t-BuOH	5,2	0,41	2,1	4,8
	n-BuOH	4,8			
	MeCN	3,4	0,17	0,6	
	CH ₂ Cl ₂	3,0	0,17	0,5	2,8
	Ciclohexano	3,3	0,17	0,6	

(a) calculados usando la ecuación de Strickler y Berg⁴⁹; (b) medidos según lo detallado en la Parte Experimental E.5.2; (c) calculados a partir de $\tau = \tau_0 \Phi_f$, (d) medidos según lo detallado en la Parte Experimental E.5.3.

Como puede verse en la Tabla 11 los τ calculados, dentro del error experimental, son del mismo orden que los valores medidos. Esto avalaría la suposición de que tanto el harmano como el nor-harmano cumplen con las condiciones de la ecuación de Strickler y Berg.

Además se calcularon los valores de k_f y k_o , donde k_o es la constante de velocidad de todos los otros procesos de desactivación de la especie excitada distintos de k_f , a partir de la definición de $\tau_0 = 1/k_f$ y de $\Phi_f = k_f / (k_f + k_o)$. Como puede verse en la Tabla 12, los valores de k_f son similares entre sí observándose una mayor dispersión en los valores de k_o obtenidos.

Tabla 12 Valores de k_f y k_o calculados a partir de τ_0 y Φ_f

Solvente	<i>nor</i> -Harmano		Harmano	
	k_f (a)	k_o (b)	k_f	k_o
	$\times 10^{-8} \text{ (s}^{-1}\text{)}$	$\times 10^{-8} \text{ (s}^{-1}\text{)}$	$\times 10^{-8} \text{ (s}^{-1}\text{)}$	$\times 10^{-8} \text{ (s}^{-1}\text{)}$
EtOH	2,78	3,40	3,23	5,73
i-PrOH	2,56	3,26	3,45	6,40
n-BuOH	1,75		2,08	
t-BuOH	1,89	2,31	1,92	2,77
MeCN	2,08	11,8	2,94	14,4
CH ₂ Cl ₂	2,56	15,8	3,33	16,3
Ciclohexano	2,44	19,7	3,03	14,8

(a) $k_f = 1 / \tau_0$; (b) $k_o = k_f(1 - \Phi_f) / \Phi_f$

En el caso de los solventes polares próticos el rendimiento cuántico de fluorescencia de las β -carbolinas es mayor que el de las mismas disueltas en los solventes polares no próticos (MeCN) y en los no polares (ciclohexano).

Este resultado podría explicarse teniendo en cuenta que el $\Phi_f = \tau / \tau_0 = k_f / (k_f + k_0)$. Si los valores k_f obtenidos en los distintos medios son similares, la diferencia se debe a diferencias en los valores de k_0 . Esta constante incluye a los otros procesos de desactivación del singulete distintos a la fluorescencia y que compiten con ésta. Estos son principalmente los procesos de conversión interna (CI) y los de cruce entre sistemas (CIS). Es decir que

$$k_0 = k_{CI} + k_{CIS}$$

La k_{CIS} se ve aumentada si el cruce se produce entre estados de distinta configuración, es decir desde un singulete de tipo $\pi-\pi^*$ a un triplete de tipo $n-\pi^*$ ²⁴. En el caso de los solventes próticos los estados $n-\pi^*$ se ven más alterados energéticamente que los de tipo $\pi-\pi^*$ debido a las interacciones de los electrones n con el protón del solvente. Por este motivo es probable que en estos solventes el estado triplete $n-\pi^*$ sea poco accesible energéticamente hablando, cosa que no ocurriría en los solventes con poca capacidad de formar puentes de hidrógeno, aumentando en estos el valor de la k_{CIS} , y por lo tanto disminuyendo el Φ_f . Cabe señalar que en el caso del diclorometano la k_{CIS} podría aumentar además debido a un efecto del tipo de átomo pesado intermolecular. También puede explicarse la diferencia observada en los valores de Φ_f si consideramos que el fluoróforo se modifica sustancialmente desde el punto de vista electrónico al formar puentes de hidrógeno, siendo entonces la especie emisora distinta en los dos tipos de solventes y por lo tanto es lógico que presenten estas especies diferentes valores de Φ_f .

Como ya se señaló, si bien el τ_0 es similar en todos los solventes elegidos, no lo es el τ ya que se tiene en cuenta en su cálculo el valor de Φ_f . Así efectivamente los valores de τ medidos en solventes con menor Φ_f son menores que aquéllos medidos en solventes donde el Φ_f es mayor.

1.2 β -Carbolinas 3,4-dihidrogenadas

1.2.1 *Espectros de absorción UV-vis. en medios líquidos*

En el caso de las β -carbolinas parcialmente hidrogenadas la asignación del tipo de transición que da origen a cada banda del espectro de absorción UV-vis. resulta más difícil.

En el caso de la especie neutra, Macanita y col.¹⁸ usando los mismos métodos que para las β -carbolinas aromáticas (método INDO por un lado y método PPP por el otro, con una geometría optimizada por el método MMX), concluyeron que el estado excitado de menor energía en la harmalina correspondería a un estado del tipo $n-\pi^*$. Esta conclusión se vería avalada por el valor del tiempo de vida intrínseco τ_0 calculado a partir de los valores medidos del tiempo de vida medio de fluorescencia τ y el Φ_f . Sin embargo esta banda no la pudieron observar en el espectro de absorción realizado en metanol, tal vez por estar esta banda solapada por otra de tipo $\pi-\pi^*$ más intensa o simplemente por ser una banda prohibida (ϵ pequeño) que no pudo ser detectada con el equipamiento empleado.

A diferencia del comportamiento espectroscópico observado para las β -carbolinas aromáticas, en el caso de la harmalina y del harmalol se notan diferencias importantes entre los espectros registrados en solventes próticos y aquéllos en solventes no próticos. Como se puede ver en las Tablas 13 y 14, en solventes no polares y polares apróticos, predominan las bandas correspondientes a las formas neutras. En solventes polares próticos, como agua y alcoholes, se observan tanto las formas neutras como las formas catiónicas dependiendo la proporción de ambas especies de las propiedades del solvente utilizado. En el caso del 2-propanol y del 2-metil-2-propanol predominan las formas neutras, mientras que en el caso de solventes con mayor carácter prótico, definido como la capacidad del solvente de donar un hidrógeno a un soluto en una unión puente de hidrógeno (parámetro α de Taft⁵²), solventes tales como metanol, etanol, etilenglicol, y en mezclas tales como metanol-agua y etanol-agua, se observan simultáneamente las absorbancias tanto de las formas neutras como de las

formas catiónicas (ver Tablas 13 y 14 y Figura 16). Estos resultados indican que la formación de la especie protonada del alcaloide como tal, se ve favorecida en presencia de alcoholes ácidos. Es más, la alta sensibilidad de estas β -carbolinas frente a la presencia de trazas de ácido en el solvente orgánico es tal que es posible detectar la presencia de agua en los alcoholes ya que ésta modifica el espectro de absorción, comportándose como un ácido frente a la harmalina y al harmalol, protonando eficazmente a la correspondiente forma neutra del alcaloide. Este comportamiento se debe al marcado carácter básico de la harmalina y del harmalol en el estado S_0 ($pK_a = 10,0^{11}$ y $10,0^{11}$ respectivamente). Los resultados obtenidos del análisis de los espectros de absorción de los análogos aromáticos, harmina y harmol ($pK_a = 8,0^{10}$ y $8,0^{13}$, respectivamente), reflejan claramente que éstos son menos básicos en el estado S_0 , no siendo posible detectar la formación de la especie catiónica en medios alcohólicos con hasta un 5% de agua haciendo uso de los espectros de absorción UV-vis. Un solvente que presenta un comportamiento que no sigue la tendencia de la formación del catión en relación directa al α de Taft es el cloroformo (ver Tabla 17, al final de este capítulo). En este caso a pesar de ser el valor de α bajo se observa la señal del catión. Esta anomalía podría deberse a la descomposición parcial del solvente para dar compuestos de carácter ácido, los que protonan al alcaloide. El cloroformo empleado fue tratado para eliminar los estabilizantes que se le adicionan comercialmente ya que entre ellos se encuentra el etanol.

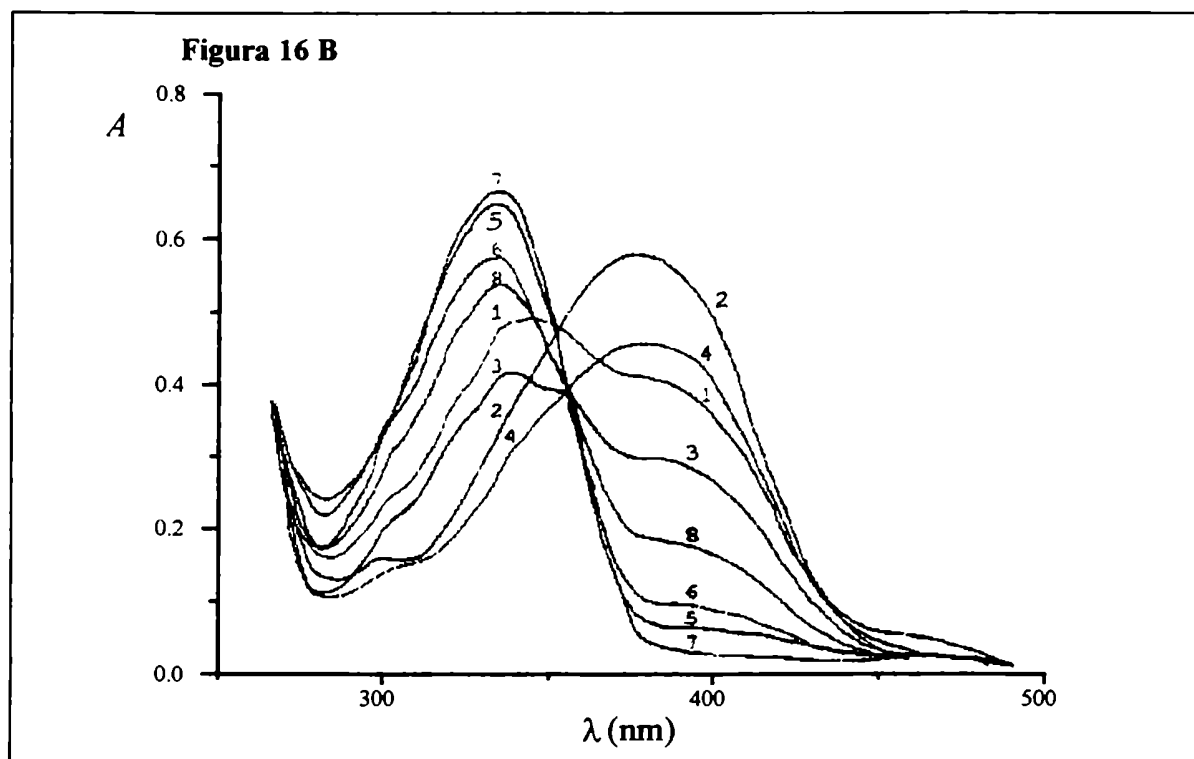
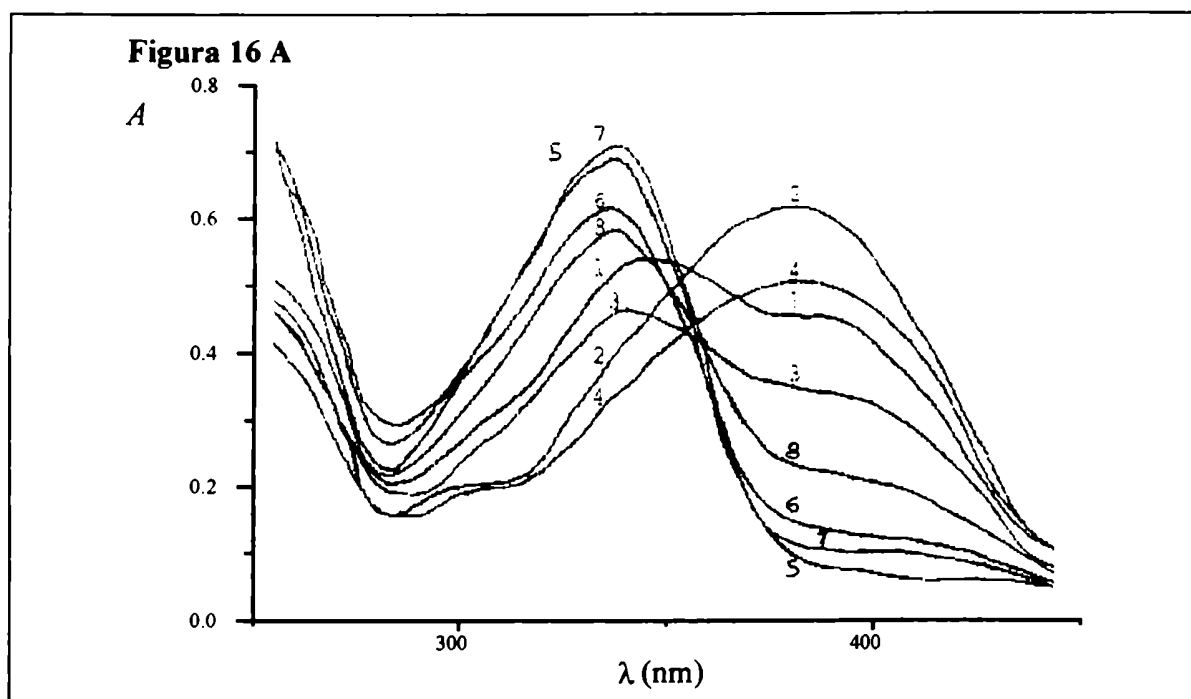


Figura 16 16A Espectros de absorción de **harmalina** ($c: 4,7 \times 10^{-5}$ M) en diversos solventes: 1, MeOH; 2, MeOH + H₂O; 3, EtOH; 4, EtOH + H₂O; 5, t-BuOH; 6, t-BuOH + H₂O; 7, i-PrOH; 8, i-PrOH + H₂O. 16B Espectros de absorción de **harmalol** ($c: 3,9 \times 10^{-5}$ M) en los mismos solventes que la harmalina.

1.2.2 Espectros de emisión fluorescente en medios líquidos

Los espectros de emisión fluorescente obtenidos en diversos solventes orgánicos se describen en las Tablas 13 y 14.

En el caso de la harmalina y del harmalol, no pudimos observar en ninguno de los medios estudiados las bandas de fluorescencia a 442 y 444 nm descritas por Dogra¹⁶ como las correspondientes a las especies neutras pese a que efectuamos las mediciones reproduciendo las condiciones experimentales descritas en lo que se refiere a solvente, concentración del alcaloide y λ_{exc} . En cierta forma no es sorprendente el no poder observar la fluorescencia de la especie neutra, ya que es sabido que los heterociclos nitrogenados que tienen su estado excitado singulete de menor energía del tipo $n-\pi^*$ generalmente tienen Φ_f bajos debido a que el cruce entre sistemas se ve altamente favorecido²⁴. El valor de Φ_f de estas especies está por debajo del límite de detección del fluorómetro utilizado, ya que en los espectros de excitación para ninguna λ_{em} se pudo observar la banda correspondiente a la especie neutra, la que sí se observaba en el correspondiente espectro de absorción.

Otros autores^{11,30} al trabajar en soluciones acuosas o alcohólicas ubican a estas bandas en la región comprendida entre 377 y 380 nm. El posible origen de estas discrepancias se discute en la sección siguiente, donde se describen los espectros de excitación fluorescente.

Como puede verse en las Tablas 13 y 14, en todos los solventes no acidificados tanto para la harmalina como para el harmalol la intensidad del máximo de fluorescencia (I) depende de la longitud de onda de excitación y no del coeficiente de absorción molar (ϵ) de la solución. Por ejemplo (Figura 17), en el caso de la harmalina en acetonitrilo si bien el ϵ es mayor a 330 nm que a 400 nm, la I de los espectros de emisión realizados excitando a 400 nm es mayor que la de los realizados excitando a 330 nm. Además al realizar los espectros de excitación a λ_{em} 440 nm, donde se ha descrito que emite la especie neutra, sólo se observa la señal correspondiente a la especie catiónica. Es decir el espectro de excitación no

es igual en forma al de absorción UV-vis, y como aquél es más sensible, a pesar de que no se vea la señal correspondiente en el espectro de absorción UV-vis existe una cierta concentración de la forma catiónica en el estado fundamental detectable en el primero. Esto también avala la propuesta de que la especie neutra no emite o lo que es lo mismo que el valor del Φ_f está por debajo del límite de detección del sistema utilizado. Entonces la I de emisión resulta proporcional a la I del espectro de excitación y no al ϵ del espectro de absorción.

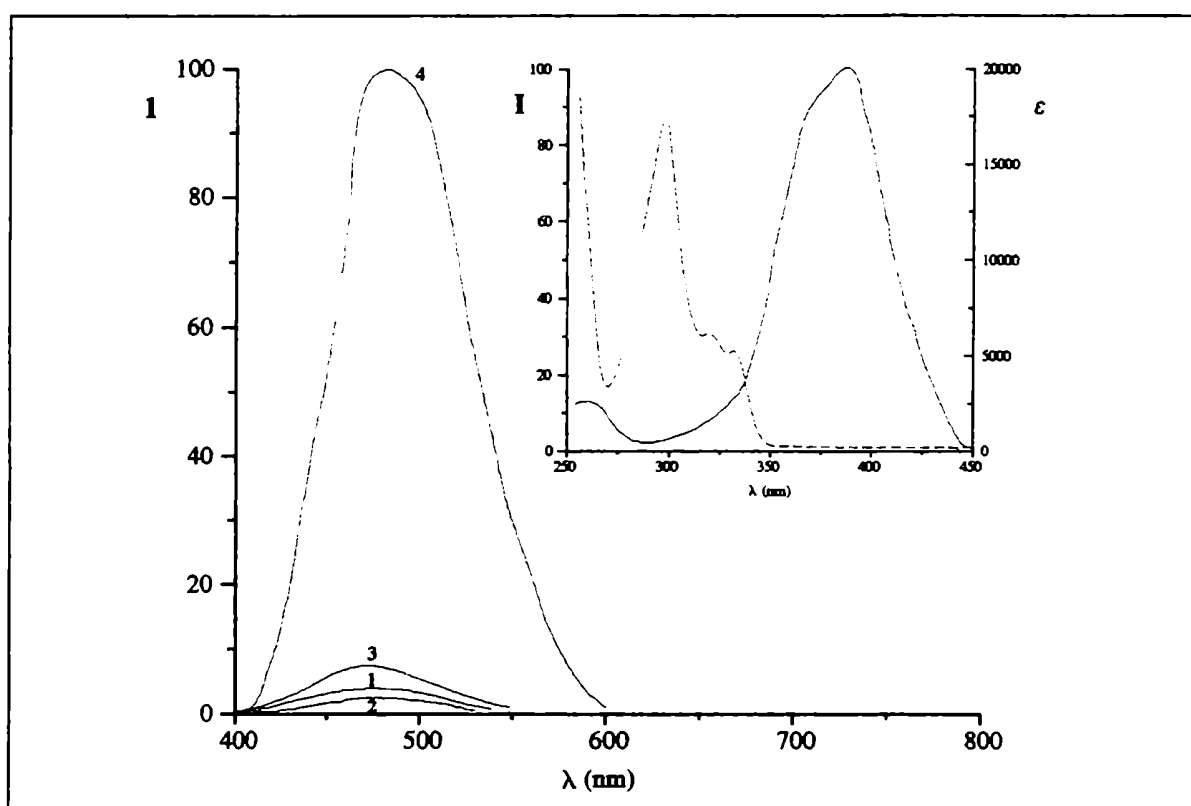


Figura 17 Espectros de emisión fluorescente de la **harmalina** en acetonitrilo a distintas longitudes de onda de excitación: 1, λ_{exc} 280 nm; 2, λ_{exc} 300 nm; 3, λ_{exc} 330 nm; 4, λ_{exc} 390 nm, c : $4,7 \times 10^{-5}$ M. En el gráfico secundario: espectro de excitación fluorescente λ_{em} 480 nm (—) y espectro de absorción (---)

1.2.3 *Espectros de excitación fluorescente en medios líquidos*

En el caso de las β -carbolinas parcialmente hidrogenadas, ya en las primeras experiencias se observó que el espectro de excitación fluorescente de la harmalina en etanol a $\lambda_{em} = 380$ nm era distinto al obtenido a $\lambda_{em} = 420$ nm. (Figura 18B, espectros 1 y 2) El primero resultaba similar tanto al espectro de excitación fluorescente como al de absorción de la harmina en su forma neutra. El segundo resultaba similar al que se obtendría por suma de los espectros de excitación fluorescente de la harmalina en su forma catiónica y el de la harmina en su forma neutra. Cuando se agregó una gota de NaOH (10 M) a una solución de harmalina en etanol puro, se observó que mientras que el espectro de absorción sólo mostraba la banda correspondiente a la harmalina neutra (Figura 18A, espectro 3), en el espectro de emisión disminuía la banda asignada a la harmalina catiónica y permanecía inalterada aquélla que había sido asignada a la harmina neutra (Figura 18C, espectro 3). Además el espectro de excitación de la harmalina en solución etanólica acidificada, a $\lambda_{em} = 390$ nm (Figura 18B, espectro 3), coincide con el de la harmina obtenido en las mismas condiciones (Figura 18B, espectro 6). Es más, cuando se agregaba harmina a la solución de harmalina en etanol se observaba un aumento en la intensidad de las señales tanto en los espectros de excitación como en los de emisión fluorescentes a $\lambda_{m\acute{a}x} = 300$ nm y $\lambda_{m\acute{a}x} = 368$ nm, respectivamente. También se observó que el espectro de excitación a $\lambda_{em} = 390$ nm para la harmalina en los distintos solventes orgánicos puros era de mucha menor intensidad que el correspondiente de la harmina. Una diferenciación espectroscópica similar se observó al comparar los espectros obtenidos para soluciones de harmalol y harmol (Figura 19). El espectro de excitación fluorescente del harmalol en 2-propanol a $\lambda_{em} = 380$ nm era distinto al obtenido a $\lambda_{em} = 440$ nm. (Figura 19B, espectros 1 y 2). El primero resultaba similar tanto al espectro de excitación fluorescente como al de absorción del harmol en su forma neutra. El segundo resultaba similar al que se obtendría por suma de los espectros de excitación fluorescente del harmalol en su forma catiónica y el del harmol en su

forma neutra. Al agregar harmol a la solución de harmalol en 2-propanol se observó un incremento de la señal asignada al harmol manteniéndose invariable la asignada al harmalol (Figura 19B y 19C, espectro 6).

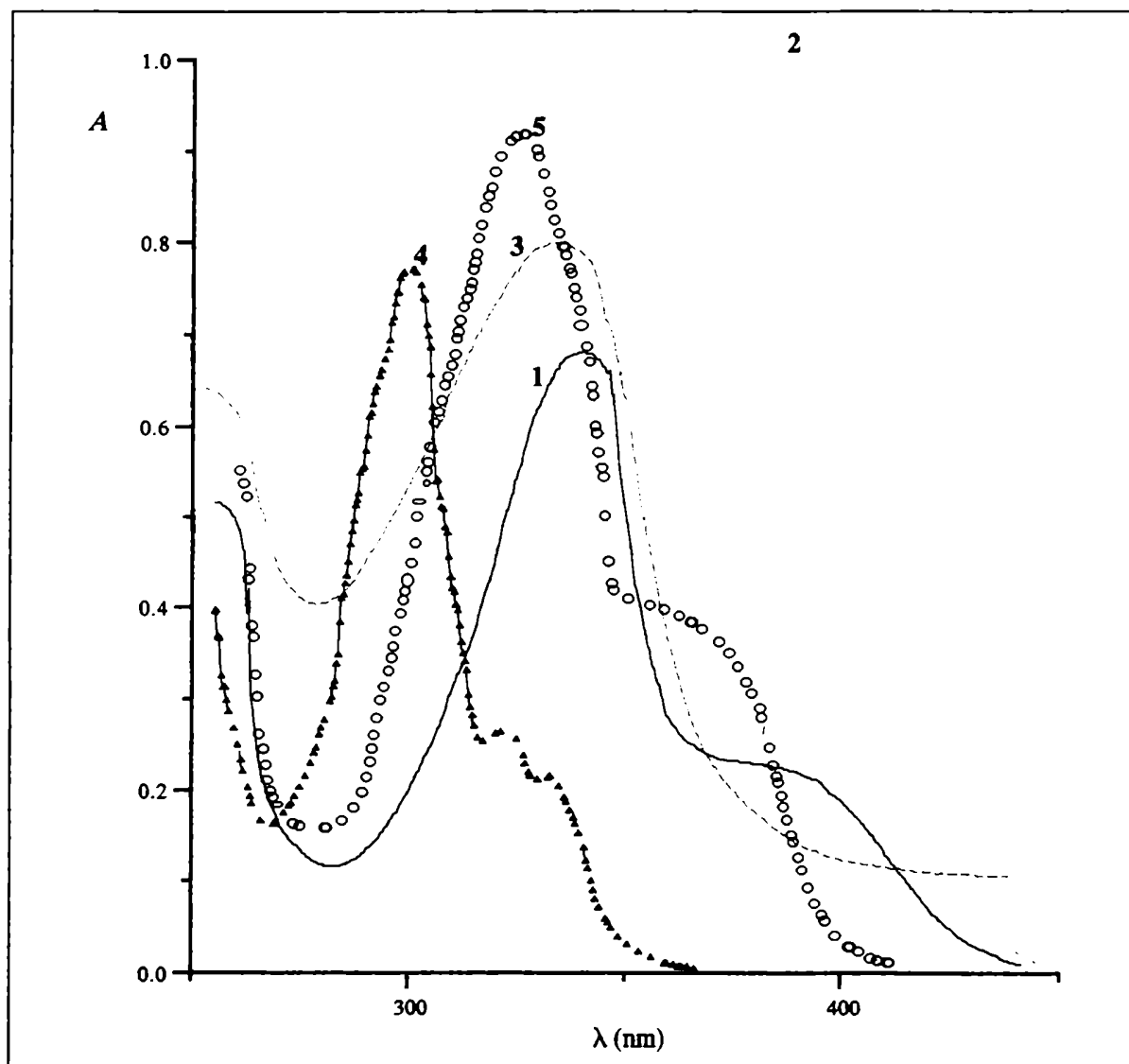


Figura 18 A Espectros de absorción de harmalina (ha) en EtOH (1, —); ha en EtOH + 1% de H₂SO₄ 0,5 M (2,); ha en EtOH + 1% de NaOH 10 M (3, ---); harmina (Ha) en EtOH (4, ▲ ▲ ▲); Ha en EtOH + 1% de H₂SO₄ 0,5 M (5, ○ ○ ○).

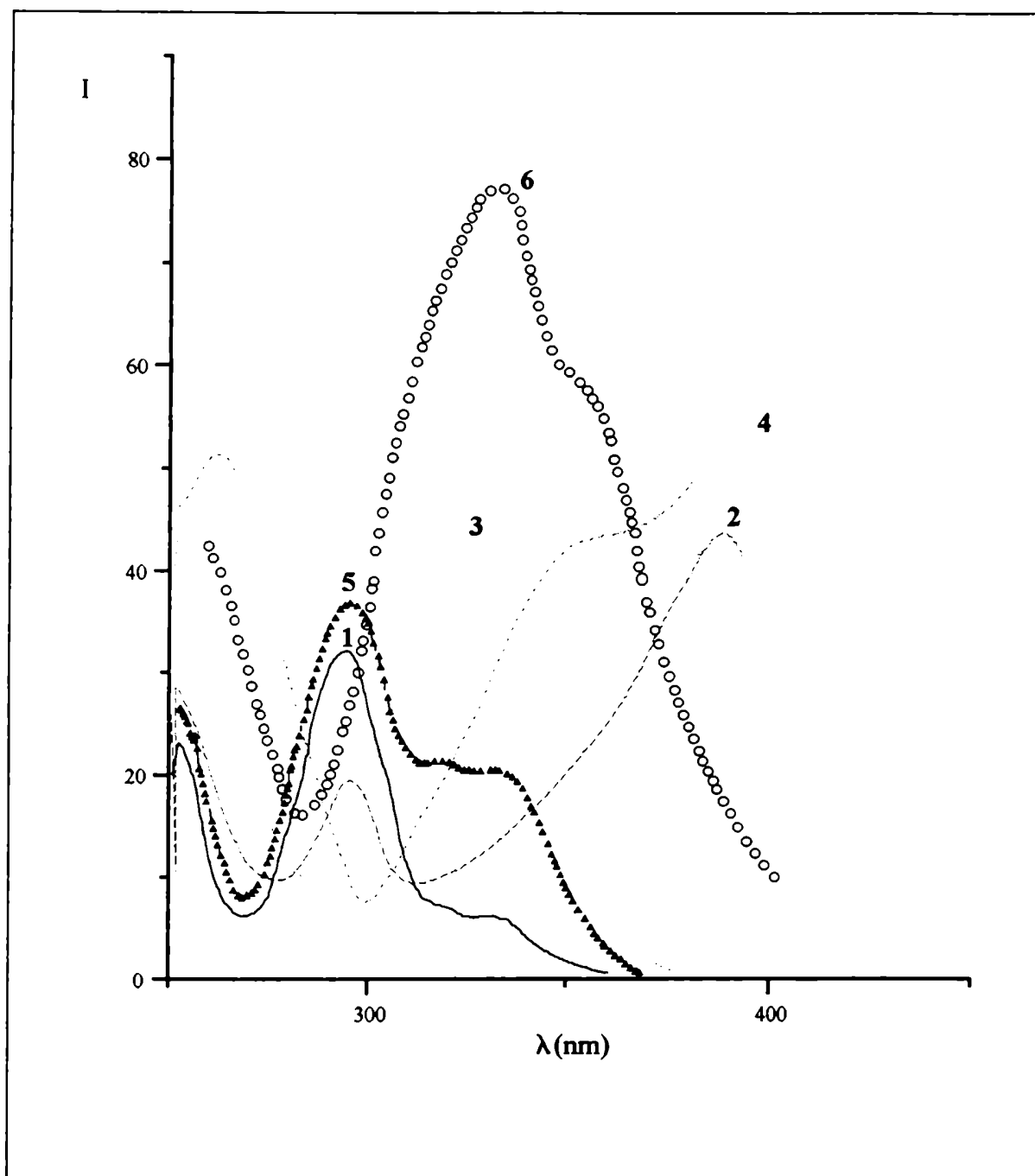


Figura 18B Espectros de excitación fluorescente de harmalina (ha) en EtOH (1, —) a λ_{em} 380 nm y (2, ----) a λ_{em} 420 nm; ha en EtOH + 1% de H_2SO_4 0,5 M (3,) a λ_{em} 390 nm y (4, - · - · -) a λ_{em} 480 nm; harmina (Ha) en EtOH (5, ▲ ▲ ▲) a λ_{em} 390 nm; Ha en EtOH + 1% de H_2SO_4 0,5 M (6, ○ ○ ○) a λ_{em} 415 nm

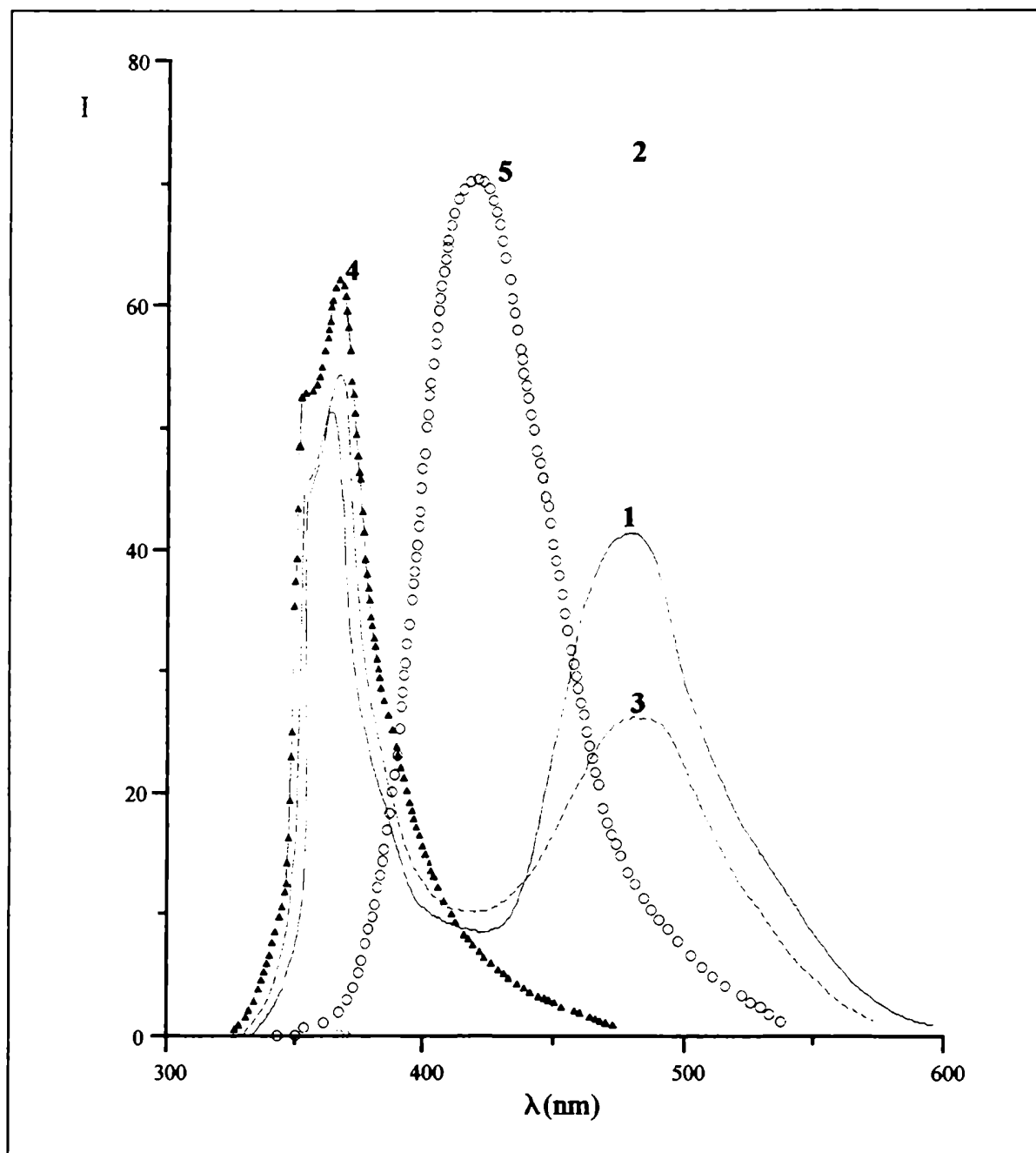


Figura 18 C Espectros de emisión fluorescente (λ_{exc} 300 nm) de harmalina (**ha**) en EtOH (1, —); **ha** en EtOH + 1% de H_2SO_4 0,5 M (2,); **ha** en EtOH + 1% de NaOH 1 M (3, ----); harmina (**Ha**) en EtOH (4, ▲ ▲ ▲); **Ha** en EtOH + 1% de H_2SO_4 0,5 M (5, ○ ○ ○).

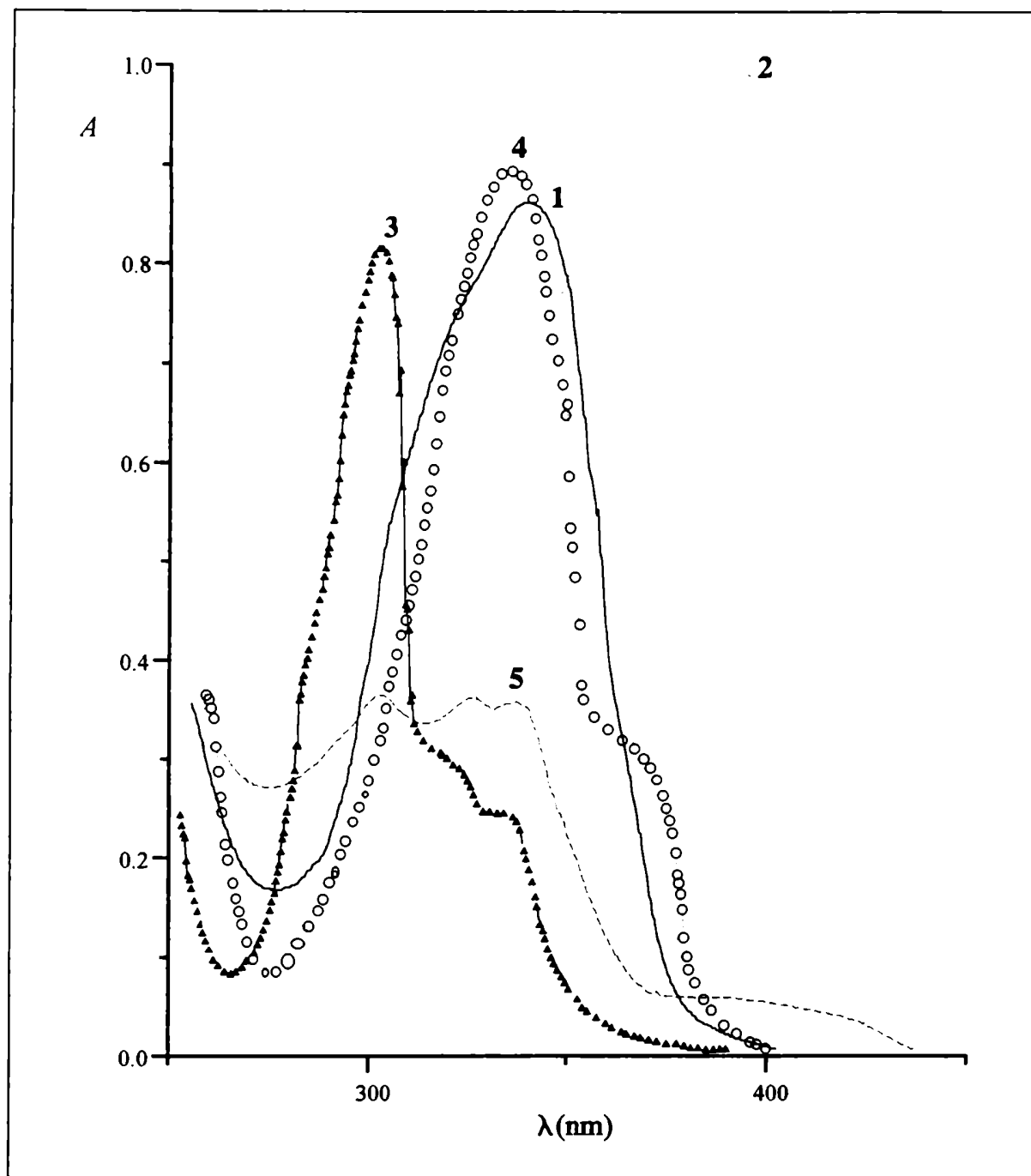


Figura 19 A Espectros de absorción de harmalol (hl) en i-PrOH (1, —); hl en i-PrOH + 1% de H₂SO₄ 0,5 M (2,); harmol (Hl) en i-PrOH (3, ▲ ▲ ▲); Hl en i-PrOH + 1% de H₂SO₄ 0,5 M (4, ○ ○ ○); hl + Hl en i-PrOH (5, — — —).

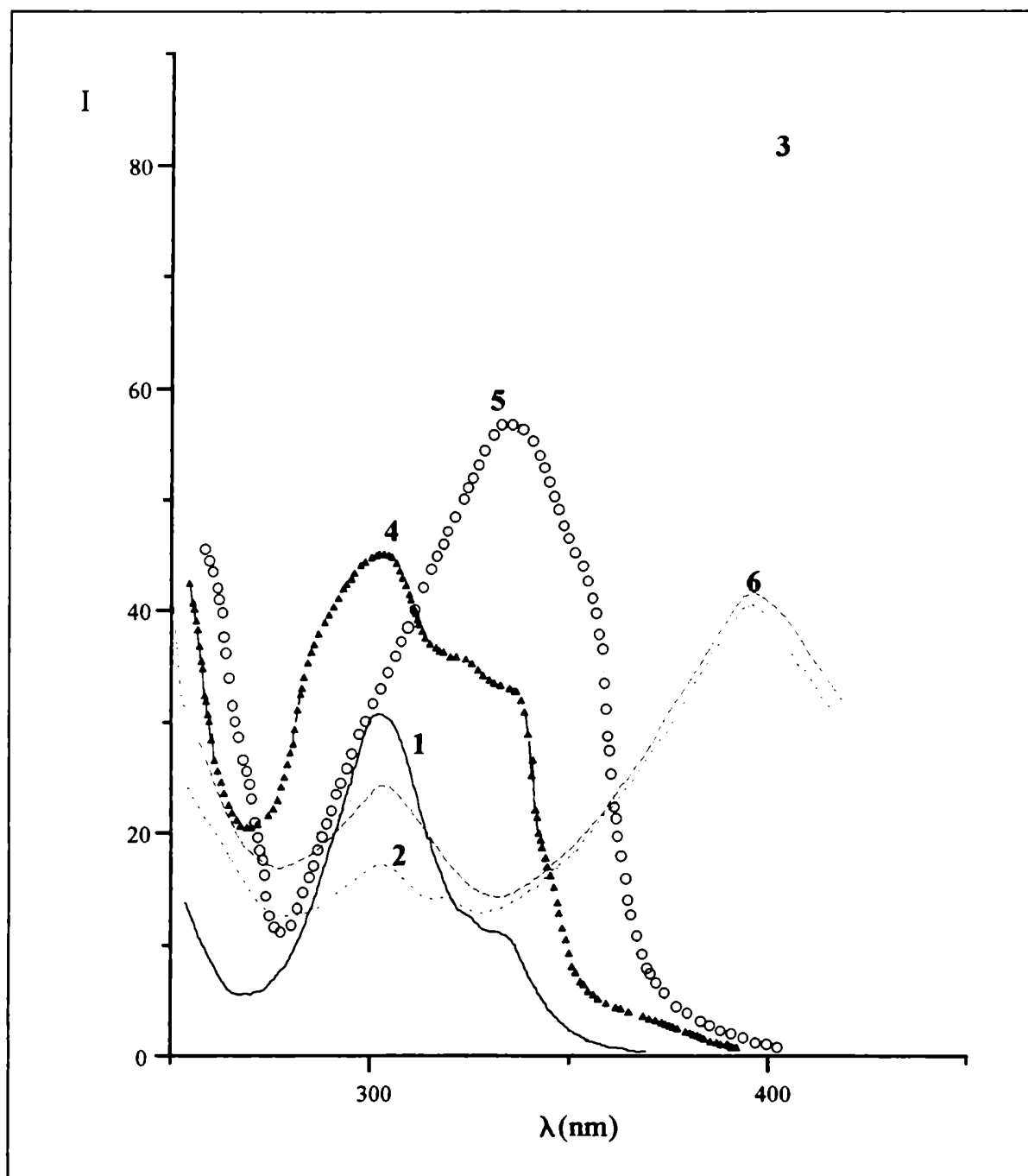


Figura 19B Espectros de excitación fluorescente de harmalol (**hl**) en i-PrOH (1, —) a λ_{em} 380 nm; **hl** en i-PrOH (2, - · - ·) a λ_{em} 440 nm; **hl** en i-PrOH + 1% de H_2SO_4 0,5 M (3,) a λ_{em} 480 nm; harmol (**Hl**) en i-PrOH (4, ▲ ▲ ▲) a λ_{em} 440 nm; **Hl** en i-PrOH + 1% de H_2SO_4 0,5 M (5, ○ ○ ○) a λ_{em} 440 nm; **hl** + **Hl** en i-PrOH (6, —) a λ_{em} 440 nm.

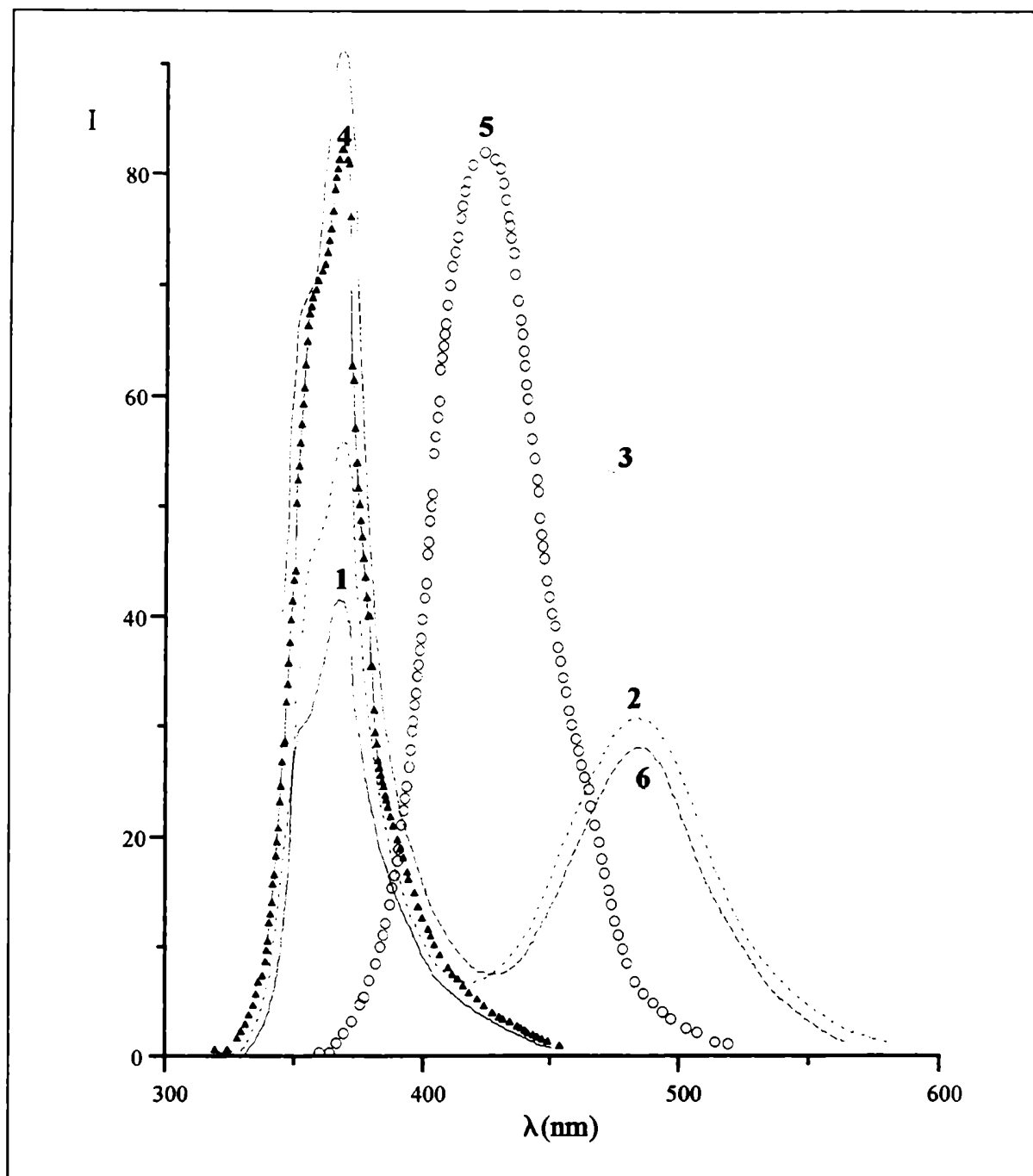


Figura 19C Espectros de emisión fluorescente de harmalol (**hl**) en i-PrOH (1, —) a λ_{exc} 300 nm y (2, - - - -) a λ_{exc} 330 nm, **hl** en i-PrOH + 1% de H_2SO_4 0,5 M (3,) a λ_{exc} 300 nm; harmol (**Hl**) en i-PrOH (4, $\blacktriangle \blacktriangle \blacktriangle$) a λ_{exc} 330 nm; **Hl** en i-PrOH+ 1% de H_2SO_4 0,5 M (5, $\circ \circ \circ$) a λ_{exc} 300 nm; **hl** + **Hl** en i-PrOH (6, - · - ·) a λ_{exc} 330 nm.

Los resultados obtenidos nos permiten concluir que tanto la harmalina como el harmalol disueltos en solventes orgánicos (Tablas 13 y 14) no presentan ni el espectro de excitación ni el de emisión correspondientes a sus formas neutras. Según estos resultados podemos afirmar que las emisiones descritas en la literatura como correspondientes a la harmalina y al harmalol en su forma neutra³⁰ se deberían en realidad a la β -carbolina aromática que estaría presente como impureza en la β -carbolina parcialmente hidrogenada comercial y/o a la que se formaría *in situ* debido a la fácil oxidación de la misma a la forma totalmente aromática.

Tabla 13 Espectros electrónicos de absorción UV-vis. y de emisión y excitación fluorescentes de la **harmalina** en solventes orgánicos a 298 K.

Solvente	Absorción(a)			Emisión			Excitación		
	$\lambda_{\text{máx}}^{(b)}$	A	$\log \epsilon$	λ_{exc}	$\lambda_{\text{máx}}$	$I^{(c)}$	λ_{em}	$\lambda_{\text{máx}}$	I
MeOH	338	0,795		260	480	155	390	-	-
	380	0,413		300	480	19	480	260	150
				330	484	97		390	655
				390	480	665			
MeOH + AS(d)	380	1,268	4,43	260	480	500	390	-	-
				300	480	90	480	258	520
				330	480	450		358(h)	690
								393	830
EtOH	336	0,812		260	479	23	390	-	-
	380	0,276		300	480	15	480	260	180
				330	480	65		389	640
				390	479	635			
EtOH + AS	380	1,171	4,32	260	479	100	390	-	-
				300	477	76	480	260	64
				330	481	518		369(h)	860
				390	480	650		392	>990
i-PrOH	336	0,962	4,26	280	478	2	390	-	-
	382	0,002		300	-	-	480	257	160
				330	480	6		263	160
				390	482	96		390	800
i-PrOH + AS	380	1,092	4,30	280	479	85	390	-	-
				300	471	72	480	257	480
				330	475	795		262	480
								360(h)	860
								391	>990
t-BuOH	334		4,16	270	480	2	390	-	-
				300			480	260	4
				330	480	7		390	28
				390	480	26			
t-BuOH + AS	378		4,28	270	475	270	390	-	-
				300	475	60	480	260	430

Tabla 13 Continuación

				330 390	474 475	440 670	360(h) 390	700 890
EG(e)	336 378	0,648 0,123		280 300 330 390	476 476 481 481	93 78 420 990	390 480 360(h) 390 520 360(h) 390	- - 258 820 990 300 500 620
EG + AS	378	0,813	4,30					
H ₂ O	258 372	0,380 1,039	3,91 4,35	300 330	473 483	76 370	380 420 316 480 391	3 112 60 500 600
MeCN	328 380	0,974 0,001	4,27	280 300 330 390	480 480 481 481	5 1 15 220	390 480 262 385	- - 28 240
MeCN + AS	378		4,39	280 300 330	477 474 477	75 72 450	390 480 262 356(h) 390	- - 290 300 700 850
CH ₂ Cl ₂	330 380	0,675 0,001	4,17	280 300 330 390	475 - 475 473	1 - 4 38	390	
CH ₂ Cl ₂ + AS	380	0,892		280 300 330	474 473 481	8 5 30	390 480 399	- - 54 160
CHCl ₃	330 382(h)	0,427 0,235		280 300 330	450 450 450	6 5 25	380 480 390	- - 24 138

Tabla 13 Continuación

		390	450	176	520	258	30
						390	57

(a) concentración: $4,7 \times 10^{-5}$ M; $A = \epsilon lc$; A , absorbancia, está indicada cuando absorbe tanto la forma neutra como la catiónica, ϵ en $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$; (b) λ en nm; (c) I , intensidad relativa de fluorescencia; (d) AS, con 1% de ácido sulfúrico 0,5 M; (e) EG, etilenglicol.

Tabla 14 Espectros electrónicos de absorción UV-vis. y de emisión y excitación fluorescentes del **harmalol** en solventes orgánicos a 298 K.

Solvente	Absorción(a)			Emisión			Excitación		
	$\lambda_{\text{máx}}^{(b)}$	A	$\log \varepsilon$	λ_{exc}	$\lambda_{\text{máx}}$	$I^{(c)}$	λ_{em}	$\lambda_{\text{máx}}$	I
MeOH	342	0,470		280	482	42	390	-	-
	382	0,365			532	32	430	392	23
				300	467	39	480	260	150
				330	485	110		392	530
				390	483	530			
MeOH + AS ^c	382	0,814	4,32	280	480	90	390	-	-
				300	470	50	480	260	400
				330	473	300		360	600
								392	800
EtOH	342	0,531		260	482	135	390	-	-
	384	0,352		300	480	18	480	260	130
				330	479	70		391	530
				390	483	530			
EtOH + AS	384	0,764	4,29	260	475	430	390	-	-
				300	469	45	480	260	44
				330	475	315		360(h)	680
								390	900
i-PrOH	340	0,702	4,25	260	477	14	390	-	-
				300	477	3	480	266	16
				330	477	8		396	100
				390	477	100			
i-PrOH + AS	386	0,846	4,33	260	474	430	390	-	-
				300	472	52	480	263	440
				330	476	360		360(h)	780
								391	1000
t-BuOH	340	0,644	4,21	280	476	13	390	-	-
				300	470	6	480	265	55
				330	478	20		394	270
				390	478	220			

Tabla 14 Continuación

t-BuOH + AS	384	0,686	4,24	280	478	140	380	-	-
				300	476	50	500	260	400
				340	475	550		360(h)	600
								390	800
EG(e)	340	0,418		280	470	20	370	-	-
	450	0,248			540	90	390	-	-
				300	470	44	410	-	-
					540	44	480	244	80
				330	470	49		387	88
					540	49	540	280	90
				390	470(h)	70		390(h)	180
					537	190		452	370
				450	541	370			
EG + AS	380	0,805	4,31	280	479	156	380	-	-
				300	467	65	480	262	500
				340	475	600		360	770
				460	476	60		391	990
							540	262	150
								360	250
								390	300
CH ₂ Cl ₂	330	0,368	3,97	260	470	4	390	-	-
				300	-	-	480	260	5
				330	470	3		360(h)	16
				390	480	20		385	22
CH ₂ Cl ₂ + AS	370	0,419	4,03	260	481	13	390	-	-
				300	464	2	480	259	12
				330	472	7		395	40
				390	481	38			
CHCl ₃	332	0,127		280	450	2	380	-	-
	376	0,103		300	-	-	450	260	15
				340	449	21		379	48
				380	446	46	550	260	2
				450	-	-		386	5
								430(h)	1

(a) concentración: $3,9 \times 10^{-5}$ M; $A = \epsilon c$; A , absorbancia, está indicada cuando absorbe tanto la forma neutra como la catiónica, ϵ en $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$; (b) λ en nm; (c) I , intensidad relativa de fluorescencia; (d) AS, con 1% de ácido sulfúrico 0,5 M; (e) EG: etilenglicol.

1.2.4 Espectros electrónicos de excitación y emisión en medios rígidos

Matrices de EtOH a 77K

Para confirmar la hipótesis de que las formas neutras de la harmalina y del harmalol no emiten, se realizaron los espectros de emisión a 77 K usando como λ_{exc} 300 y 330 nm, dado que a estas longitudes de onda absorbe casi exclusivamente la especie neutra. Aun en estas condiciones experimentales no se observaron señales de emisión correspondientes a la especie neutra, sino las correspondientes a la especie catiónica. En el caso de la harmalina los espectros obtenidos tanto de excitación como emisión fluorescentes coincidían con los descritos en literatura¹⁴: los realizados a 77 K presentan mejor resolución que los realizados a 298 K, observándose según lo esperado un corrimiento hacia el rojo en el de excitación y hacia el azul en el de emisión (ver Tabla 15 y Figura 20). Como en el caso del harmalol los espectros realizados no coincidían exactamente con los descritos en la literatura²⁰ se los realizó tanto en etanol como en etanol absoluto y en etanol acidificado, pudiéndose a partir de estos últimos asignar las señales correspondientes a la especie catiónica. A partir de estos datos se pudieron luego asignar las bandas observadas en la solución etanólica y en etanol absoluto. En ambos solventes se observó mayoritariamente la señal correspondiente al catión y a nivel de trazas la correspondiente al zwitterión (ver Tabla 15, λ_{exc} 450 nm: $\lambda_{m\acute{a}x}$ 489 nm en etanol, $\lambda_{m\acute{a}x}$ 493 nm en etanol absoluto, λ_{em} 510 nm: $\lambda_{m\acute{a}x}$ 411 y 440 nm en ambos solventes, ver Figura 21). Es decir algo de zwitterión ya estaría formado en el estado fundamental y así al ser excitado se ve su emisión.

Desde el punto de vista teórico sería posible la observación de fosforescencia al trabajar en medio rígido teniendo en cuenta que el estado excitado de menor energía es de tipo $n-\pi^*$. Sin embargo no fue posible detectar fosforescencia alguna. Esto podría explicarse proponiendo que la desactivación por caminos no radiativos es muy eficiente aun a baja temperatura, dado que las mediciones se realizaron en una solución sólida preparada con un solvente con alta capacidad para formar uniones puente de hidrógeno, las que ayudarían a la

desactivación por procesos no radiativos y a la formación en el estado electrónico excitado de la forma catiónica fluorescente. Los espectros descrito en la literatura como correspondientes a las formas neutras^{14,20} corresponderían al análogo aromático, el que estaría presente en el medio como una impureza según lo explicado anteriormente.

Matrices de sílica gel, celulosa y muestra en polvo

En forma complementaria, para confirmar las asignaciones antes mencionadas y poder extender el estudio comparativo realizado con las β -carbolinas aromáticas se hicieron mediciones en fase sólida adsorbiendo los sustratos sobre un soporte adecuado (sílica gel y papel) (Tabla 16). Cuando la harmalina comercial fue adsorbida sobre una placa de sílica gel tratada previamente según lo detallado en la Parte Experimental E.4 y desarrollado el cromatograma con acetato de etilo-etanol, se observaron con luz UV dos manchas ($\lambda_{exc} = 366 \text{ nm}$; Rf 0,30 y 0,70). Al tratar al harmalol en forma similar se observaron también dos manchas de: Rf: 0,25 y 0,60. En la placa sembrada con harmalina, el espectro de emisión fluorescente correspondiente a la mancha de Rf 0,70 coincidía con el obtenido para la harmina en las mismas condiciones (ver Tabla 7), mientras que en el caso de trabajar con harmalol la mancha de Rf 0,60 presentaba un espectro de emisión similar al del harmol. Por lo tanto sólo el espectro correspondiente a la mancha de Rf 0,30 sería el de la harmalina pura y el correspondiente a la mancha de Rf 0,25 el del harmalol puro. Para ambos alcaloides sólo se observó la señal correspondiente al catión (ver Tabla 16 y Figuras 20A y 21A, espectro 4 y Figuras 21A y 21B, espectro 5). En el caso del harmalol también se registró el espectro de la muestra adsorbida sobre papel, observándose nuevamente la señal del catión (Tabla 16). Este resultado podría explicarse teniendo en cuenta que tanto los componentes de la sílica gel como los de la celulosa del papel son capaces de formar puentes de hidrógeno con las β -carbolinas, siendo estas interacciones las responsables de la fijación del sólido sobre el soporte. Estos aductos estarían pre-formados en el estado fundamental como puede verse en los correspondientes espectros de excitación (Figuras 20A y 21A y

Tabla 16). Esto coincide con lo informado previamente^{14,20} respecto de los espectros de emisión obtenidos en fase adsorbida: sólo se observan las señales correspondientes a las especies cargadas.

A partir de los espectros realizados sobre los clorhidratos de la harmalina y del harmalol en estado sólido se pudo asignar la señal correspondiente a los cationes cuando los mismos son fijados como tales sobre el soporte sólido. Es interesante señalar que mientras que en el harmalol neutro no se observó fluorescencia alguna en el caso de la harmalina se observaron señales corridas hacia el azul las que podrían deberse a la especie neutra. Entonces en el harmalol dicho fenómeno puede deberse a que el solapamiento de la banda de emisión del catión y la banda de absorción del zwitterión conduce a una reabsorción de la fluorescencia de la forma neutra. Cabe señalar que no se observó fosforescencia en ningún caso pese a lo informado en la literatura. Esto se debería a que el entorno molecular que ofrece la matriz rígida favorece la desactivación del estado excitado triplete por vía térmica o bien a que la eficiencia de formación de tripletes sería muy baja, estando la fosforescencia por debajo de los límites detectables experimentalmente en nuestras condiciones de trabajo.

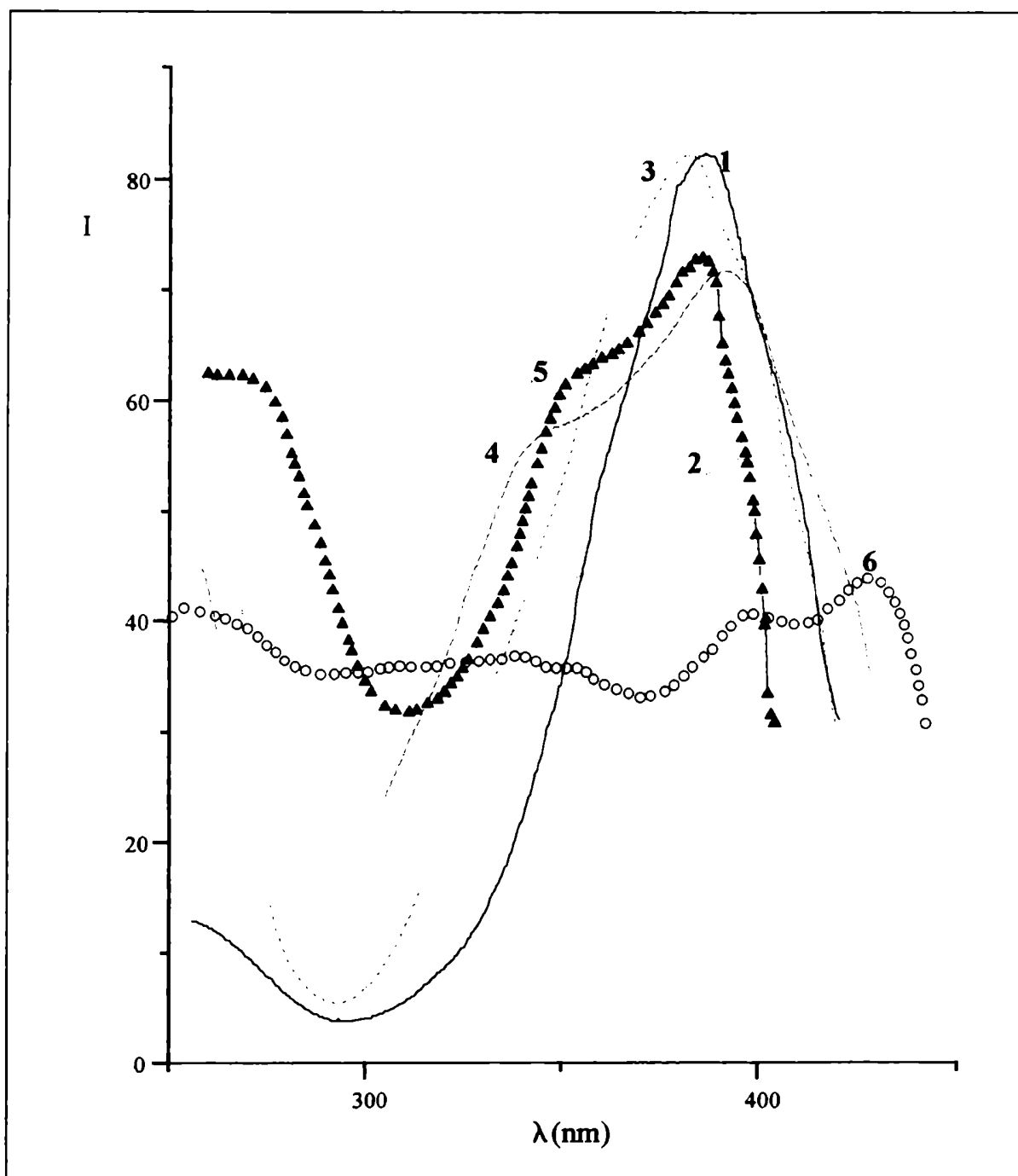


Figura 20A Espectros de excitación fluorescente de harmalina (ha) ($c: 4,7 \times 10^{-5}$ M) en EtOH a 298 K (1, —) a λ_{em} 480 nm; ha en EtOH + 1% de H_2SO_4 0,5 M a 298 K (2) a λ_{em} 480 nm; ha en EtOH a 77K (3 —) λ_{em} 440 nm; ha adsorbida sobre sílica gel (4, - - - -) a λ_{em} 440 nm; ha en polvo (5, ▲ ▲ ▲) a λ_{em} 440 nm y ha.HCl en polvo (6, ○ ○ ○) a λ_{em} 480 nm.

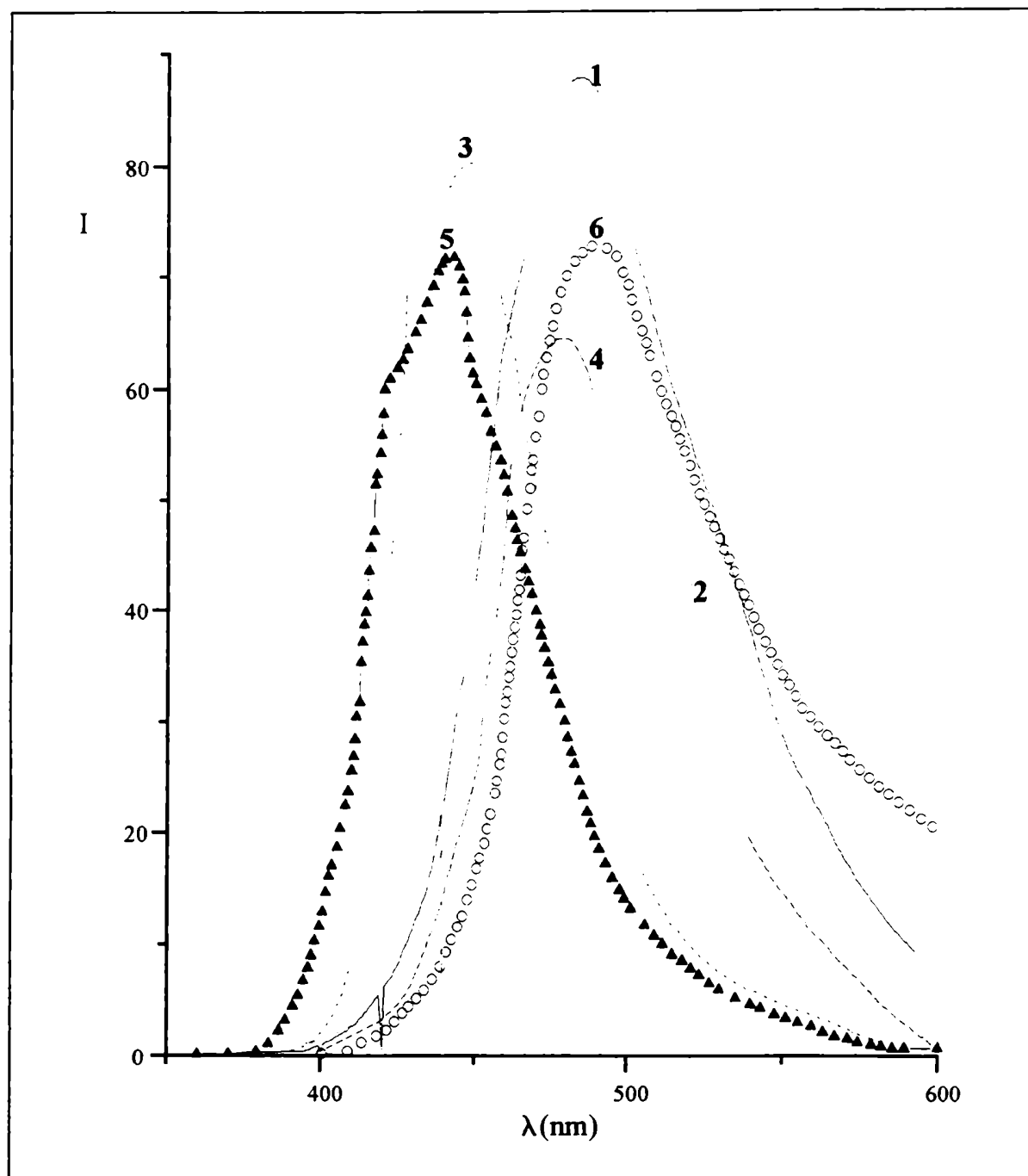


Figura 20B Espectros de emisión fluorescente de harmalina (**ha**) ($c: 4,7 \times 10^{-5}$ M) en EtOH a 298 K (1, —) a λ_{exc} 330 nm; **ha** en EtOH + 1% de H_2SO_4 0,5 M a 298 K (2) a λ_{exc} 300 nm; **ha** en EtOH a 77K (3 —) a λ_{exc} 330 nm; **ha** adsorbida sobre sílica gel (4, - · - ·) a λ_{exc} 320 nm; **ha** en polvo (5, ▲ ▲ ▲) a λ_{exc} 300 nm y **ha.HCl** en polvo (6, ○ ○ ○) a λ_{exc} 300 nm;

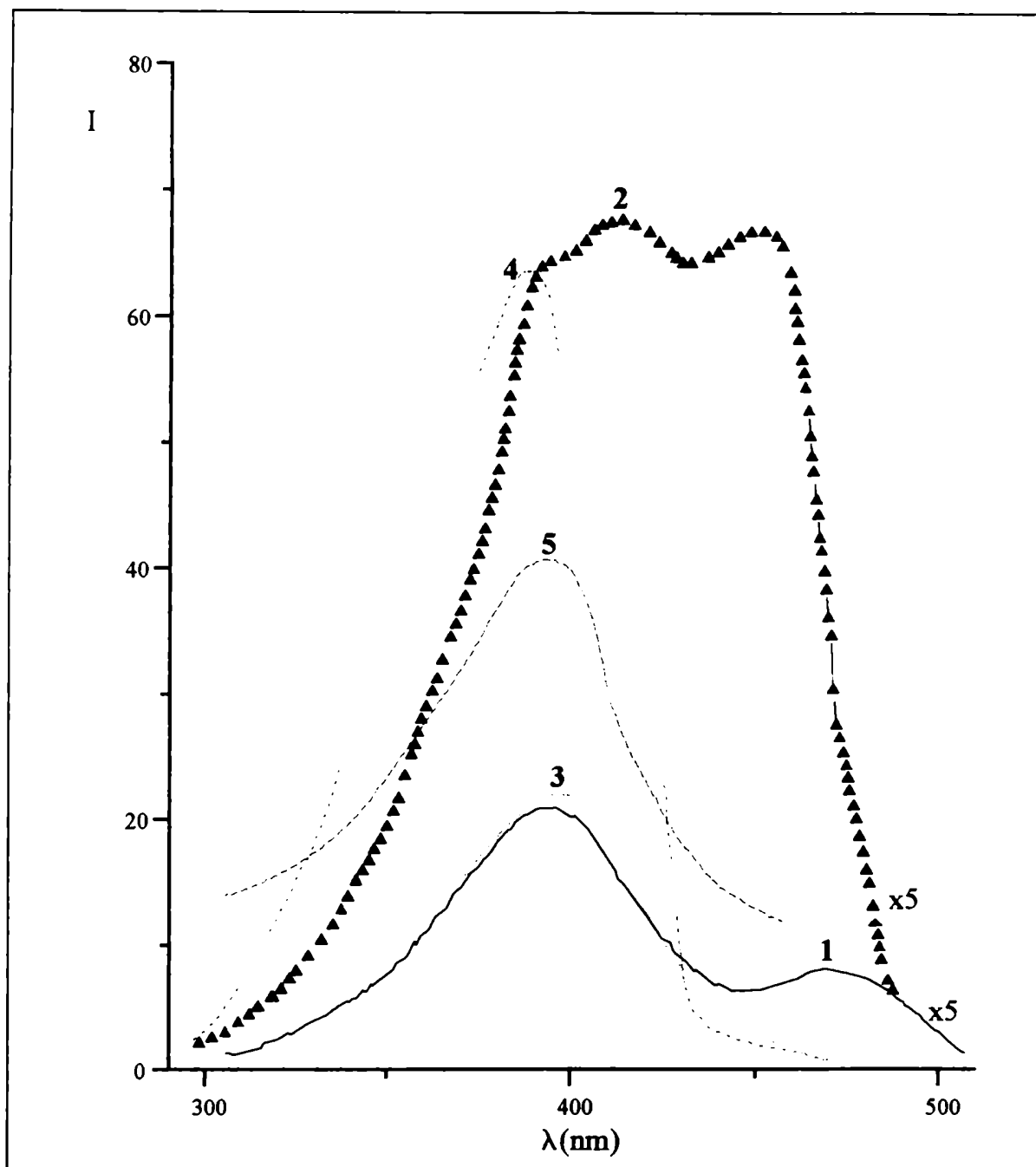


Figura 21A Espectros de excitación fluorescente de harmalol (**hl**) (c : $3,9 \times 10^{-5}$ M) en EtOH absoluto a 298 K (1, —) a λ_{em} 550 nm y a 77 K (2, $\blacktriangle \blacktriangle \blacktriangle$) λ_{em} 510 nm; **hl** en EtOH + 1% de H_2SO_4 0,5 M a 298 K (3) a λ_{em} 550 nm y a 77 K (4, - · - · -) a λ_{em} 510 nm; **hl** adsorbido sobre sílica gel (5, ----) a λ_{em} 460 nm.

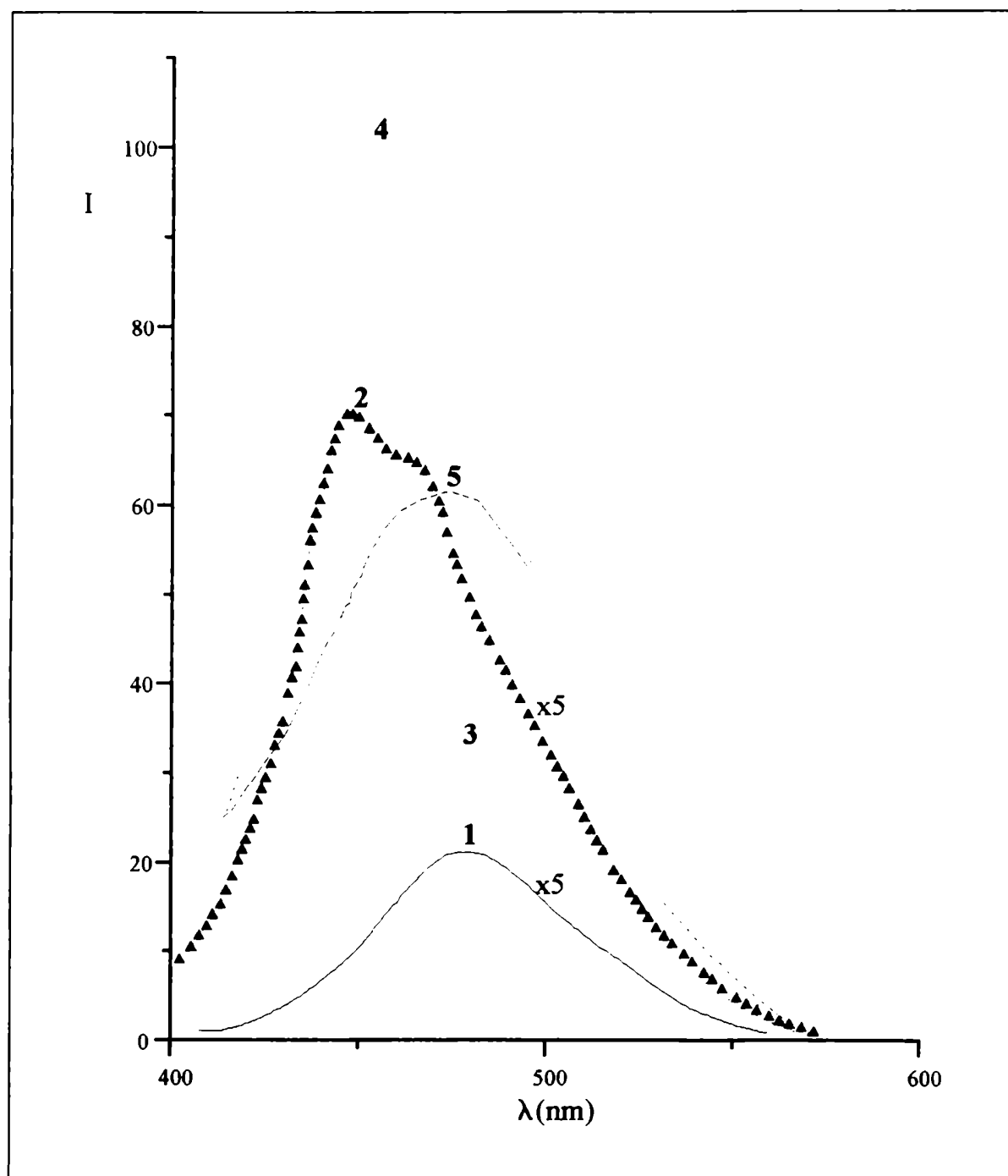


Figura 21B Espectros de emisión fluorescente de harmalol (**hl**) (c : $3,9 \times 10^{-5}$ M) en EtOH absoluto a 298 K (1, —) a λ_{exc} 340 nm y a 77 K (2, $\blacktriangle \blacktriangle \blacktriangle$) λ_{exc} 340 nm; **hl** en EtOH + 1% de H_2SO_4 0,5 M a 298 K (3) a λ_{exc} 340 nm y a 77 K (4, - · - · -) a λ_{exc} 340 nm; **hl** adsorbido sobre sílica gel (5, ----) a λ_{exc} 380 nm.

Tabla 15. Espectros electrónicos de emisión y de excitación fluorescentes de la **harmalina** y del **harmalol** en solución etanólica a 298 K y a 77 K(a)

Solvente	Temperatura	Emisión			Excitación		
		$\lambda_{\text{exc}}^{(b)}$	$\lambda_{\text{máx}}$	I(c)	λ_{em}	$\lambda_{\text{máx}}$	I
<u>Harmalina</u> (d)							
EtOH 96%	298 K	300	480	20	380	-	-
		330	482	170	420	385	15
		380	480	790	440	385	190
	77 K	300	432	75	380	-	-
			445	150	420	380	930
		340	432	330			
		445	325				
<u>Harmalol</u> (e)							
EtOH 96%	298 K	280	478	25	380	-	-
		300	478	10	480	262	130
		340	475	115		391	395
		380	479	330	550	262	38
		470	547	15		391	100
						465	20
	77 K	280	445	75	380	-	-
			484	150	430	370	315
		340	447	330		390	365
			468	325	480	370(h)	500
		380	447	600		395	680
			468	630		412(h)	620
		450	489	390		440(h)	350
					510	370(h)	260
						392	350
						411	355
						440	300
EtOH absoluto	298 K	280	476	10	380	-	-
		300	476	4	480	262	50
		340	476	40		392	165
		380	475	130	550	262	16
		470	548	13		392	40

Tabla 15 Continuación

					470	16
	77 K	280	445	32	380	-
			489	57	430	352
		340	447	130		368
			460(h)	110		386
		380	447	225	450	350(h)
			466	220		370(h)
		400	448	225		389
			470	225	480	350(h)
		420	448	110		393
			487	180		408(h)
		450	493	160	510	393(h)
		470	497	7		411
						450
						130
EtOH + AS(f)	298 K	280	477	56	380	-
		300	473	21	480	260
		340	480	325		358(h)
		380	482	770		388
		450	480	33	550	260
		470	-	-		358(h)
						388
						205
	77 K	280	450	25	380	-
		300	442	76	430	>990
			460(h)	71	480	>990
		340		>990	510	360(h)
		380		>990		390
		450	465(h)	16		620

(a) en celdas redondas: celdas de cuarzo Perkin Elmer de 2 mm de diámetro interno; (b) λ en nm; (c) I, intensidad relativa de emisión; (d) concentración: $4,7 \times 10^{-5}$ M, (e) concentración: $3,9 \times 10^{-5}$ M; (f) con 1% de ácido sulfúrico 0,5 M.

Tabla 16 Espectros electrónicos de emisión y de excitación fluorescentes de **harmalina** y **harmalol** en estado sólido a 298 K

	Emisión			Excitación		
	$\lambda_{exc}(a)$	$\lambda_{m\acute{a}x}$	I(b)	λ_{em}	$\lambda_{m\acute{a}x}$	I
<u>Harmalina</u>						
en polvo	270	420	52	380	-	-
		441	58	400	-	-
	300	426	31	440	360(h)	31
		441	34		381	35
	380	420	60	520	360	5
		439	68		390	7
adsorbida sobre silica gel(c)	255	478	83	440	360	38
	320	475	62		390	46
				520	360	57
					390	70
clorhidrato en polvo	280	492	76	420	-	-
	300	492	55	480	394	60
	380	490	62		428	65
	430	480	77			
<u>Harmalol</u>						
adsorbido sobre silica gel(c)	380	460	150	460	370	140
					392	170
				500	360(h)	105
					390	130
adsorbido sobre papel(d)	280	-	-	450	396	5
	300	-	-	550	396	1
	340	458	3			
	380	458	5			
clorhidrato en polvo	280	511	355	380	-	-
	300	511	340	480	282	260
	380	510	320		392	260

Tabla 16 Continuación

	440	511	380		438	260
				510	283	360
					393	360
					438	360

(a) λ en nm; (b) I: intensidad relativa de emisión; (c) placas de sílica gel convenientemente activadas; (d) papel Whatman n° 41.

Conclusiones

Como señalamos previamente para iniciar el estudio del comportamiento fotoquímico de las β -carbolinas en medios orgánicos debían primero realizarse los espectros electrónicos, debido a que había muy poca información sobre estos alcaloides en soluciones de dichos solventes. En este trabajo por primera vez se han descripto y comparado entre sí los espectros electrónicos de absorción UV-vis, excitación y emisión fluorescentes del *nor*-harmano, harmano, harmina y harmol en una serie de solventes orgánicos así como los de la harmalina y el harmalol a 298 y 77 K.

Hemos visto que las β -carbolinas totalmente aromáticas en solventes orgánicos presentan bandas debidas a la absorción de su forma neutra en la región UV, hasta aproximadamente 360 nm. Estos espectros UV-vis. son sensibles al agregado de ácido, formándose la especie protonada, catiónica, la cual absorbe a longitudes de onda mayores que la correspondiente especie neutra. Esto implica que es posible irradiar y monitorear selectivamente al catión en presencia de la especie neutra. Por su parte las β -carbolinas 3,4-dihidrogenadas son aún más sensibles a la presencia de ácidos, observándose según el solvente usado la señal de la especie neutra, protonada y/o zwitteriónica.

Los espectros de excitación resultaron similares a los de absorción en el caso de las β -carbolinas totalmente aromáticas, no siendo así en el caso de las 3,4-dihidrogenadas. Esto nos permitió postular que en estos alcaloides el Φ_f de la especie neutra es mucho menor que el de la especie catiónica, ya que no pudimos detectar la fluorescencia de la forma neutra aunque sí la del catión.

Para todas las β -carbolinas aromáticas estudiadas tanto la especie neutra como la catiónica presentan una eficiencia cuántica de fluorescencia alta. La especie neutra no es posible aislarla completamente en soluciones acuosas pero sí en solventes orgánicos. Por lo tanto se determinaron los rendimientos cuánticos de fluorescencia de esta especie obteniéndose valores que oscilaron entre 0,11 y 0,45. A partir de éstos y de los valores de

tiempo de vida de fluorescencia intrínseco τ_0 se calcularon en forma teórica algunos tiempos de vida medios de fluorescencia τ .

Estos alcaloides siguen presentado fluorescencia medible aun en soportes poco ortodoxos como son la sílica gel, el papel o directamente la muestra en polvo. En estos casos no se observó un comportamiento uniforme aunque en general se detectaron las señales correspondientes al catión o al zwitterión aun en los casos de las β -carbolinas totalmente aromáticas. En matrices rígidas a bajas temperaturas (77 K) estos compuestos presentaron el comportamiento habitual: mayor resolución de las señales, un leve corrimiento batocrómico en el espectro de excitación y uno de tipo hipsocrómico en el de emisión respecto de los espectros realizados a temperatura ambiente.

Tanto por espectroscopía de absorción UV-vis como por emisión fluorescente se logra caracterizar la formación de un complejo entre la β -carbolina y el ROH del tipo 1:2 en solventes no polares no próticos como el ciclohexano y el isopentano. Pudimos determinar tanto por métodos clásicos (ecuación de Foster³⁹) como por métodos más modernos (análisis factorial) la constante de formación de estos complejos.

En la Tabla 17 se presentan los valores de algunos de los parámetros más utilizados que describen distintas propiedades de los solventes utilizados, como son el α (capacidad donora de puente de hidrógeno), β (capacidad aceptora de puente de hidrógeno) y π^* (polarizabilidad) de Kamlet y Taft, el $E_T(30)$ de Reichardt, el Z de Kosower y el DN (donor number) y AN (acceptor number) de Gutmann^{52,53}.

Tabla 17. Parámetros característicos de algunos solventes orgánicos⁵³.

Solvente	α	β	π^*	$E_T(30)$	Z	DN	AN
Ciclohexano	0,00	0,00	0,00	30,9	60,1	0,0	
CCl ₄	0,00	0,10	0,28	32,4		0,0	8,6
CH ₂ Cl ₂	0,13	0,10	0,82	40,7	64,7	1,0	20,4
CHCl ₃	0,20	0,10	0,58	39,1	63,2	4,0	23,1
MeCN	0,19	0,40	0,75	45,6	71,3	14,1	18,9
Dioxano	0,00	0,37	0,55	36	64,5	14,3	10,3
Eter Etilico	0,00	0,47	0,27	34,5		19,2	
Etilenglicol	0,90	0,52	0,92	56,3	85,1	20,0	
MeOH	0,98	0,66	0,60	55,4	83,6	30,0	41,3
EtOH	0,86	0,75	0,54	51,9	79,6	32,0	37,1
i-PrOH	0,76	0,84	0,48	49,2	76,3	36,0	33,5
t-BuOH	0,42	0,93	0,41	43,7	71,3	38,0	27,1
n-PrOH	0,84	0,90	0,52	50,7	78,3		37,3

Las frecuencias máximas de absorción de las β -carbolinas aromáticas, que se agrupan en la Tabla 18, presentan, en general, valores (en orden creciente) parecidos para los alcoholes, luego el acetonitrilo, éter etílico, dioxano, luego los solventes halogenados y finalmente el ciclohexano.

Tabla 18 Valores de las frecuencias máximas de absorción (en cm⁻¹) de β -carbolinas aromáticas en solventes orgánicos.

	<i>nor</i> -Harmano	Harmano	Harmina	Harmol
Ciclohexano	29412	29412		
CCl ₄	29070	29240	30120	
CH ₂ Cl ₂	29070	29240	30120	29940

CHCl ₃	29070	29240	30120	
MeCN	28902	29070	30120	29940
Dioxano	28902	29070		
Eter Etilico	28902	29070		
MeOH	28571	28736	29762	29586
EtOH	28409	28571	29586	29586
i-PrOH	28409	28571	29586	29586
t-BuOH	28409	28736	29586	29586
n-PrOH	28409	28571		

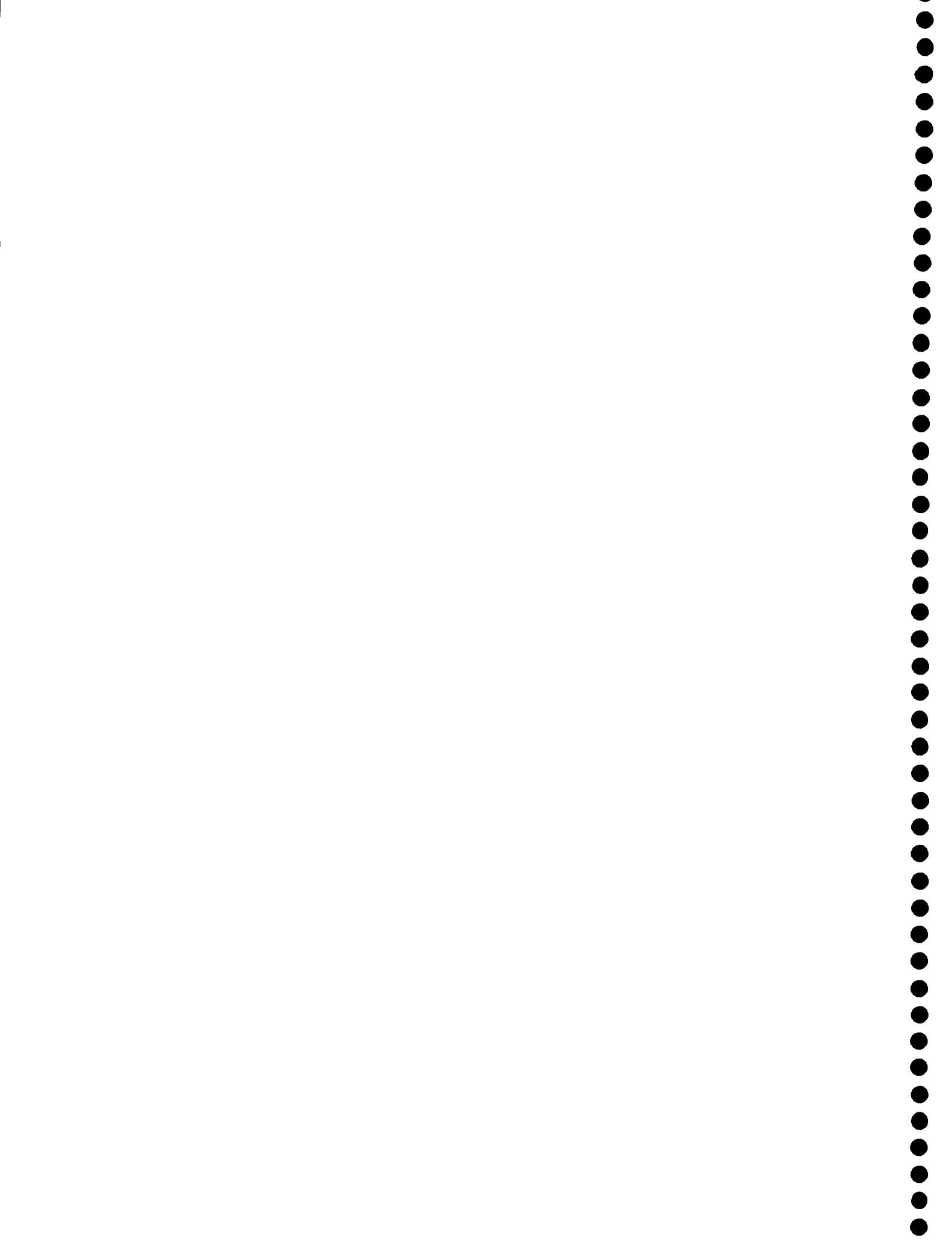
Si comparamos los valores de las frecuencias máximas de absorción de las β -carbolinas con los valores de los parámetros que describen la polaridad de los solventes utilizados, la tendencia observada es la misma que la que se observa en los valores de β y DN. Ambos parámetros reflejan la capacidad donora de un par de electrones, por lo tanto sería éste el factor que más influye en la estabilización del estado fundamental del alcaloide, ya que las β -carbolinas puede actuar tanto como donores (a través del N piridínico) o como aceptores (a través del H pirrónico) de pares de electrones.

Como señalamos antes los espectros electrónicos de estos alcaloides indican que éstos son especialmente sensibles a la presencia de ácidos en el medio. Por lo tanto decidimos estudiar más en profundidad esta característica, describiendo los resultados obtenidos en el próximo capítulo.



CAPÍTULO 2

EQUILIBRIOS ÁCIDO-BASE EN SOLVENTES ORGÁNICOS



Introducción

Como señalamos en el Capítulo 1, uno de los primeros trabajos en donde se estudia en forma detallada el comportamiento fluorescente del *nor*-harmano en función del pH en solución acuosa, es el de Sakurovs y Ghiggino⁸. Usando técnicas de fluorescencia en estado estacionario y resuelta en el tiempo midieron los tiempos de vida de fluorescencia del catión (forma protonada) a distintos valores de pH y del zwitterión a pH 14, pero no se pudo medir el de la especie neutra ya que su tiempo de vida era menor que 300 ps (límite del equipamiento usado). Los autores también determinaron los valores de pK en el estado fundamental y de pK* en el estado excitado de los equilibrios CN, CZ, NA, ZA (Figura 22) por el método de Förster³⁵.

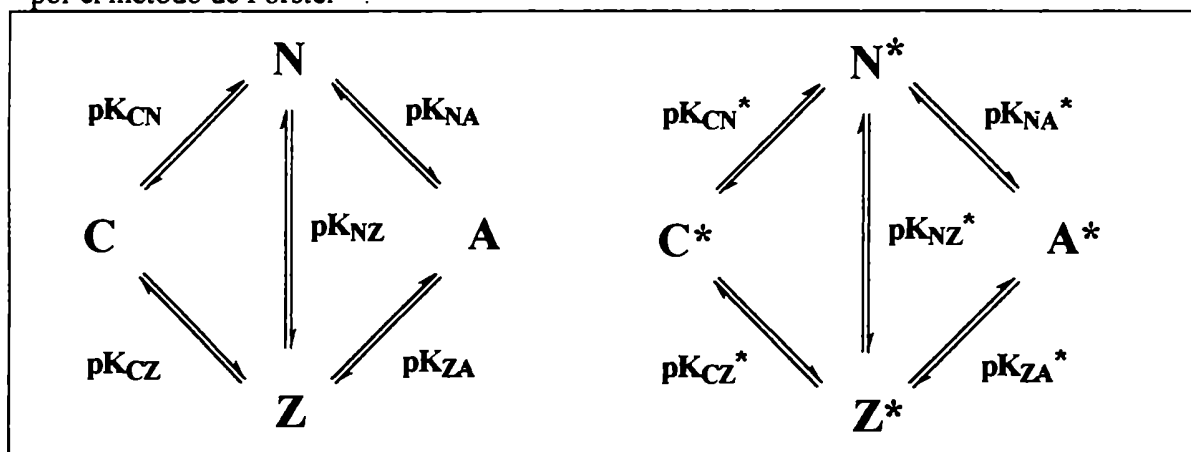


Figura 22 Equilibrios ácido-base de β-carbolinas aromáticas en los estados electrónicos fundamental (a la izquierda) y excitado (a la derecha).

Los autores⁸ describieron que cuando excitaban específicamente a la especie neutra veían la emisión de la especie catiónica, siendo constante la intensidad de la emisión fluorescente en el rango de pH comprendido entre 10 y 13. Concluyeron entonces que el nitrógeno piridínico en el estado excitado es una base más fuerte que el hidroxilo, ya que es capaz de abstraer un protón del agua. Si esto no fuera así, es decir si los hidroxilos ya formados en el medio estuvieran involucrados en el mecanismo de transferencia del protón,

se esperaría un cambio apreciable en los espectros de emisión en ese rango de pH. En ningún momento los autores observaron la emisión de la especie aniónica ya que al excitar a pH adecuado a esta especie observaban la señal de emisión característica de la especie zwitteriónica. Este hecho les sugirió que debería ocurrir una rápida protonación del anión en el estado excitado para generar el zwitterión.

En ese mismo año, 1982, Wolfbeis y col. describieron los equilibrios ácido-base del harmano⁶, de la harmina y del harmol⁷ en soluciones acuosas. En el caso del harmano, así como en el de la harmina, detectaron tres especies en el estado electrónico fundamental (espectroscopía de absorción UV-vis) y cuatro en el estado electrónico excitado (espectroscopía de emisión fluorescente). En el caso del harmano la formación del zwitterión es predicha por medio de la ecuación de Förster: pK_{CN} : 7,37 y pK_{NA} : 14,6; pK_{CN}^* : 12,0 y pK_{NA}^* : 8,65, obteniéndose valores similares para las correspondientes constantes de equilibrio de la harmina. Los valores de pK también fueron medidos mediante una titulación fluorométrica obteniéndose valores similares a los provenientes del ciclo de Förster, excepto en el caso del harmol donde se obtuvieron valores de pK en el estado excitado similares a los obtenidos en el estado fundamental.

Tomas Vert y col. han realizado una serie de estudios cuyo objetivo es comparar las propiedades ácido-base de las β -carbolinas en su estado electrónico fundamental con aquéllas en los estados electrónicos excitados S_1 y T_1 , llevando a cabo sus trabajos especialmente en medios acuosos. Así, en 1983 determinaron¹⁰ nuevamente los pK y pK^* del *nor*-harmano, del harmano, de la harmina y de la 2-metil-harmina, los primeros espectroscópicamente y los segundos haciendo uso de la ecuación de Förster. En 1984 estos autores determinaron¹¹ los mismos parámetros para la harmalina y el harmalol. A nuestro juicio, los valores de pKa (S_1) no son del todo confiables ya que las bandas de emisión de las especies neutras para la harmalina y el harmalol están mal asignadas, tal cual se discute en el

Capítulo 1 del presente trabajo. Complementariamente en 1985 describieron¹³ un estudio similar para el harmol. En otro trabajo de 1985 los mismos autores determinaron¹² los valores de pK^* del T_1 del *nor*-harmano, del harmano y de la harmina a partir de los espectros de emisión fosforescente registrados a 77 K en matriz de EPA (éter etílico : isopentano : etanol, 5:5:2). También estudiaron para los mismos sustratos los espectros de emisión fluorescente a esa temperatura. Paralelamente, registraron los espectros luminiscentes correspondientes a las especies protonadas en fase dispersa sobre matrices de celulosa. Finalmente, en 1987 hicieron^{14,20} el mismo tipo de estudio con la 2-metil-harmina, la harmalina, el harmol y el harmalol, pero utilizando en estos casos como matriz, a 77 K, soluciones de etanol con agregado de ácido sulfúrico o hidróxido de sodio, siempre asignando a nuestro juicio en forma dudosa la emisión de las especies neutras de la harmalina y del harmalol.

Independientemente, Dogra y Krishnamurthy¹⁵ determinaron para la harmalina y el harmalol en medio acuoso los valores de pK de los distintos equilibrios que se establecen en los estados S_0 y S_1 , primero por métodos fluorométricos y luego compararon estos resultados con los obtenidos por el método de Förster. Estos mismos autores¹⁶ estudiaron el equilibrio prototrópico del harmano, la harmina, el harmol, la harmalina y el harmalol en soluciones acuosas de acidez creciente. Así, detectaron la presencia de señales que asignaron al monocatión y al dicatión (protonación del C-6) en el estado electrónico fundamental y las del monocatión, del dicatión y del tricatión (protonación del O del grupo hidroxilo o metoxilo) en el estado excitado. Cabe señalar que Balón Almeida y col.⁵⁴ obtuvieron evidencias, por estudios de RMN-¹³C, que en estas condiciones se produciría una sulfonación del C-6 antes que una protonación. Al reproducir las condiciones descriptas nosotros obtuvimos resultados similares a los de Balón Almeida. Dogra y col.¹⁶ también determinaron la constante de equilibrio entre el monocatión y el dicatión, K_{MC-DC} , espectrofotométricamente. Los valores así obtenidos les sugirieron que los compuestos con

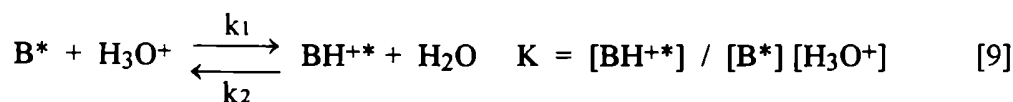
oxígeno fenólico son más básicos que los no fenólicos, los compuestos con grupo metoxilo son menos básicos que los análogos con un hidroxilo y que las 3,4-dihidro β -carbolinas son más básicas que las correspondientes β -carbolinas aromáticas. También estudiaron para la harmalina y el harmalol el quenching de la fluorescencia del MC producido por el protón obteniendo valores para k_q de $1,3 \times 10^9$ y $8 \times 10^8 \text{ M s}^{-1}$, respectivamente.

M. Balón Almeida y col. también hicieron una serie de estudios investigando propiedades ácido base de β -carbolinas en soluciones acuosas. En trabajos de los años 1986 y 1988 describieron^{55,56} la determinación de las constantes de ionización del grupo NH pirrólico de varias β -carbolinas (*nor*-harmano, harmano, harmina, harmalina, 1,2,3,4-tetrahidroharmina, harmol y harmalol) en soluciones de hidróxido de sodio concentrado. Los valores de pK fueron calculados usando la función de acidez H_L y en el caso del harmol y de harmalol usando también la Función de Exceso de Acidez, indicando los valores obtenidos que estos compuestos son ácidos más fuertes que el indol. En opinión de los autores, este hecho puede explicarse debido a que la mayor extensión de la conjugación del sistema aromático al formarse el anión resulta a su vez en una mayor estabilización de la carga por resonancia que en el simple anillo indólico. Este mismo argumento explicaría porqué la acidez se incrementa con el grado de aromaticidad de la β -carbolina en el orden 1,2,3,4-tetrahidro β -carbolina < 3,4-dihidro β -carbolina < β -carbolina aromática. Los autores también mostraron que la sustitución en el anillo β -carbonílico del hidrógeno en el C-7 y en el C-1 por grupos diferentes no produce un cambio notable en los valores de pK, ya que estos sustituyentes no aportan formas adicionales de resonancia al anión resultante. Finalmente concluyeron que los grupos NH pirrólicos del harmol y del harmalol resultaron menos ácidos que los de la harmina y la harmalina, debido a que aquellas moléculas pierden primero el protón correspondiente al grupo fenólico dando lugar a una carga negativa sobre el oxígeno fenólico, la cual desestabilizaría algunas formas de resonancia del ahora dianión. También investigaron las características de la emisión fluorescente de las mismas β -

carbolinas en los medios de basicidad creciente antes descriptos^{57,58}. En todos los casos observaron una banda de emisión fluorescente nueva en soluciones acuosas de hidróxido de sodio de H_L mayor que 16, la cual asignaron como la correspondiente a la especie aniónica, excepto en los casos del harmol y del harmalol en los cuales la asignaron al dianión. Además, calcularon los correspondientes valores de pK^* por medio del ciclo de Förster, resultando éstos del orden de 6 unidades menores que el pK , lo cual indica que el grupo NH es más ácido en el estado electrónico excitado que en el estado electrónico fundamental. La excepción surgió en el caso del harmalol ya que éste resultó menos ácido en el estado electrónico excitado. Los autores sugirieron como explicación el hecho que una mayor contribución de las formas canónicas quinoidales en el caso de esta β -carbolina justificaría su menor carácter ácido. En trabajos más recientes, los mismos autores⁵⁹ describieron las propiedades ácido-base en soluciones acuosas de 1,2,3,4-tetrahidro- β -carbolinas así como de 3,4-dihidro- β -carbolinas y de β -carbolinas aromáticas con distintos sustituyentes en el anillo bencénico. En el rango de pH empleado observaron sólo las especies neutras y catiónicas en los espectros de absorción y de emisión fluorescente, mientras que las especies zwitteriónicas sólo se detectaron en los espectros de emisión fluorescente. Sólo en medios altamente básicos, fuera de la escala de pH, lograron detectar las especies aniónicas. Los valores de pK los determinaron espectrométricamente a 25°C y los valores de pK^* fueron estimados a partir del ciclo de Förster.

En un trabajo reciente, Draxler y Lippitsch⁵⁰ investigaron la cinética del equilibrio ácido base en el estado electrónico excitado del *nor*-harmano así como el mismo equilibrio en el estado fundamental en soluciones acuosas de distinto pH. Planteando las ecuaciones correspondientes y con los resultados obtenidos de las experiencias realizadas haciendo uso de la técnica de fluorescencia resuelta en el tiempo, pudieron determinar los valores de las constantes de velocidad de los distintos equilibrios. Cuando la velocidad de un proceso

igual a la velocidad del proceso inverso se dice que se ha alcanzado el equilibrio. Entonces el equilibrio entre dos especies B^* y BH^{+*} se describe según:



$k_1 = k_1' + k_1'' [H_3O^+]$, donde k_1' es la constante de velocidad de *pseudo* primer orden de abstracción del protón del agua, y k_1'' es la constante de velocidad de abstracción del protón del H_3O^+ .

$k_2 = k_2' + k_2'' [OH^-]$, donde k_2' es la constante de velocidad de *pseudo* primer orden de transferencia del protón al agua, y k_2'' es la constante de velocidad de transferencia del protón al OH^- .

en el equilibrio: $[B^*] = [BH^{+*}]$ y $k_1 = k_2$.

entonces: $[H_3O^+] = K_a$ y $k_1' + k_1'' [H_3O^+] = k_2' + k_2'' [OH^-]$

Con esta ecuación y con los valores obtenidos de las constantes de velocidad calcularon los valores de pK^* de los distintos equilibrios. Los valores correspondientes a pK_{CN} y pK_{NA} coincidieron con los determinados por el método de Förster

En la Tabla 19 se resumen los valores informados en la literatura para los distintos equilibrios ácido-base de β -carbolinas aromáticas y 3,4-dihidro β -carbolinas en soluciones acuosas, cuyos aspectos más destacados se han reseñado brevemente.

Tabla 19 Valores de pK de los distintos equilibrios ácido-base de β -carbolinas aromáticas y 3,4-dihidro β -carbolinas en soluciones acuosas

β -Carbolina	Equilibrio:								Referencia
	CN pK(a)	pK*(b)	CZ pK	pK*	NA pK	pK*	ZA pK	pK*	
<i>nor</i> -Harmano	7,2	13,0	10,9	4,1	14,5	8,0	10,8	16,9	10
	7,9	14,7	10,9	4,1	14,5	8,0	11,5	15,0	8
	6,5	12,2			14,5	7,7			50
	6,85								31
	7,2(d)	13,9(d)							12
		(12,7)(c)							
Harmano	7,7	12,8							10
	7,37	12,0			14,6	8,65			6
		(11,4)(c)							
	7,34	13,24							31
	7,7(d)	13,6(d)							12
		(13,1)(c)							
Harmina	8,0	12,9	11,5	6,0	14,5	8,8	11,0	15,7	10
	7,70	12,55			> 14	$\Delta pK =$			7
		(12,5)(e)				7,02(f)			
	7,73	8,13							31
	8,0(d)	14,2(d)							12
		(14,1)(c)							
Harmol	8,0	13,6	8,2	6,2	9,4	4,4	9,1	11,9	13
	7,56	14,84	7,56	4,38	9,65	7,06	9,65	16,88	7
		(7,23)(e)		(7,23)(e)					
	9,51								31
	8,0(d)	14,4(d)			9,4	7,9			20
Harmalina	10,0	19,5							11

	9,54	13,04							31
	9,6	19,5	(13,9)(e)	14,9	—	—	(15,5)(e)	16	
		(10,7)(c)							
	10,0(d)	21,5(d)							14
Harmalol	10,0	16,2	8,6	2,3	10,1	2,9	11,5	19,5	11
	11,3								31
			9,8	2,3			11,6	19,5	16
							(12,6)(e)		
	10,0(d)	22,6(d)							14

(a) pK del estado fundamental; (b) pK del estado excitado S_1 ; (c) pK del estado excitado T_1 ; (d) determinados a 77 K; (e) determinado por titulación fluorimétrica; (f) del ciclo de Förster, ecuación [19] pág. 125.

En este trabajo tomaremos como valores de pK de referencia medidos en agua a los informados por Tomas Vert y col.^{10-14,20}, ya que este grupo de investigadores fue el que determinó los valores correspondientes para todos los compuestos estudiados.

Los valores de pK_{CN} de las β -carbolinas (Tabla 19) son mayores que los del análogo sin anillo indólico, la acridina²⁵, cuyo $pK = 5,60$. Esto es lógico ya que al incrementar la densidad de carga negativa en el núcleo aromático la facilidad de aceptar un protón se ve incrementada, lo que se refleja en un mayor valor de pK_{CN} .

En general todos los autores^{11,16,31} coinciden en que las β -carbolinas 3,4-dihidrogenadas son más básicas que las totalmente aromáticas, debido a la menor deslocalización del par electrónico n (piridínico) en la nube electrónica π de aquellas respecto de las totalmente aromáticas y en que el pK^*_{CN} es mayor que el pK_{CN} .

Propiedades ácido-base de las β -carbolinas en solventes orgánicos

Uno de los pocos trabajos publicados en el que se estudian las propiedades ácido-base de las β -carbolinas en soluciones no acuosas, es el realizado por Becker, Macanita y col.¹⁸ en 1992. Estos autores describieron los distintos equilibrios ácido base en el estado electrónico excitado, en distintos solventes orgánicos, usando al benceno como modelo de solvente no polar y al metanol como modelo de solvente polar prótico neutro. Encontraron que en metanol el espectro de absorción de la harmalina presentaba una nueva banda en la región comprendida entre 360 y 390 nm, no observando este fenómeno en solventes no polares como el ciclohexano, el benceno y el dioxano, o en solventes polares apróticos como el acetonitrilo. Esta nueva banda se vio aumentada por la presencia de agua en el medio (por ejemplo, en mezclas de dioxano agua 3:2) y también por la presencia de ácido (por ejemplo, en metanol acidificado con HCl). En este último tipo de solvente también se observaron nuevas señales en los espectros de las otras β -carbolinas estudiadas (*nor*-harmano, harmano y harmina). Respecto de los espectros de emisión fluorescente, en benceno observaron que la naturaleza del espectro era independiente de la longitud de onda de excitación utilizada, cosa que no ocurría en el caso de soluciones metanólicas. En estos casos, a pesar de excitar a la especie neutra, se observaron hombros en la señal de emisión de esta especie, los cuales fueron asignados a la especie catiónica y a la zwitteriónica, excepto en el caso de la harmalina donde observaron una sola señal que asignaron a la especie catiónica. Estas asignaciones se efectuaron midiendo los tiempos de vida de fluorescencia de cada especie y registrando la emisión a distintas longitudes de onda. En todas la β -carbolinas estudiadas observaron que aun excitando la especie neutra (N) en metanol podían ver la emisión del catión (C*), con lo cual los autores concluyeron que: 1) C* se formaría a partir de N*, y 2) como el decaimiento de emisión fluorescente a 350 nm es monoexponencial, la conversión de C* a N* no ocurriría en forma detectable. Por un razonamiento similar también concluyeron que Z* se formaría exclusivamente a partir de N* y que la conversión de Z* a N* no sería detectable. Estas conclusiones estarían también avaladas por los cálculos de

densidad de carga electrónica que los autores efectuaron, los cuales predicen un aumento de la densidad de carga sobre el N piridínico y una disminución de ésta en el N pirrólico en el estado electrónico excitado S_1 .

Cabe señalar que ese mismo año (1992) nosotros publicamos⁶⁰ un trabajo donde describimos los espectros electrónicos de absorción y excitación y emisión fluorescentes de la harmalina en diferentes solventes orgánicos, en el que efectuamos independientemente asignaciones similares a las de estos autores, a pesar de no contar con el instrumental necesario para hacer mediciones por espectroscopía resuelta en el tiempo. En el año 1993 publicamos⁶¹ un estudio del mismo tipo para el harmalol. Estos resultados ya han sido presentados y discutidos en el Capítulo 1 del presente trabajo.

Equilibrios prototrópicos en solventes orgánicos

En el presente trabajo usaremos la definición de ácido y base de Bronsted: ácido es aquella sustancia capaz de ceder un protón y base es aquella capaz de aceptarlo.

Las propiedades ácido-base y la constante dieléctrica de un solvente son factores que influyen notablemente en la energía libre de solvatación de los iones de un electrolito dado. Esta a su vez determina el grado de disociación del mismo y en el caso de un ácido determina la constante de acidez K_a .

En un solvente S, la K_a de un ácido AH es la constante del siguiente equilibrio



En solventes no donores de protón es importante el equilibrio de homoconjugación:



Este equilibrio se debe a que la especie A⁻ no es estabilizada suficientemente por solvatación y forma un puente de hidrógeno con su ácido conjugado.

Poco se sabe de los efectos de solvatación en solventes distintos del agua. En principio los efectos de solvatación son más fáciles de estudiar en solventes de constante dieléctrica más alta ya que son capaces de solvatar mejor los iones formados⁶². Desde ese punto de vista un solvente orgánico apropiado resulta ser el acetonitrilo ya que cumple con esta condición ($D = 37,5$)⁶³.

En el presente trabajo nos propusimos estudiar el equilibrio de protonación de las β-carbolinas:



Es conocido que la solvatación que ejerce el acetonitrilo sobre los iones amonio y sus correspondientes bases libres es distinta a la que ejerce el agua. En principio se esperaría que el comportamiento de éstas en acetonitrilo fuera intermedio entre el observado en agua y en fase gaseosa⁶⁴.

Ya ha sido estudiado y descripto el equilibrio de protonación de diversas aminas en acetonitrilo⁶⁴. En estos casos la influencia del equilibrio de homoconjugación entre las formas neutra y protonada de la amina es menor ya que el acetonitrilo es capaz de solvatar mejor los cationes formados. También se estudiaron los equilibrios de varias aminas midiendo los valores de la K_f de homoconjugación, presentándose en la Tabla 20 algunos de los resultados obtenidos:

Tabla 20 Valores de pKa y K_f de algunas aminas en MeCN y H₂O⁶⁴

Amina	K _f (a)	pKa MeCN	pKa H ₂ O	pKa MeCN - pKa H ₂ O
Trimetilamina	6	17,61	9,76	7,85
Trietilamina	---	18,46	10,65	7,81
Tri- <i>n</i> -butilamina	---	18,09	10,89	7,20
Piridina	4	12,33	5,17	7,16
Anilina	---	10,56	4,58	5,98
1,3-Difenilguanidina	---	17,90	10,0	7,90

(a) solvente: MeCN

Como surge de dicha tabla, se observó que la homoconjugación aumenta cuando aumenta la fuerza de la base B y cuando aumentan el número de átomos de hidrógeno ácidos en el ácido conjugado BH⁺, observándose también que los requerimientos estéricos son importantes y condicionan estos equilibrios. Los autores concluyeron que la homoconjugación resulta ser importante en el caso de las aminas alifáticas primarias pequeñas y en el de las aminas alifáticas cíclicas secundarias e insignificante para las aminas terciarias no cíclicas.

2.1 Determinación de pKa en acetonitrilo

Teniendo en cuenta las características ya descritas de los espectros electrónicos de las β -carbolinas en sus formas neutra, protonada y zwitteriónica en solventes orgánicos se consideró que era posible determinar el pKa de las mismas en uno de estos medios: el acetonitrilo. Se midió entonces el pKa en su estado electrónico fundamental haciendo uso de la espectroscopia de absorción UV-vis. Para ello se siguió el siguiente método⁶⁵: se tiene un indicador de pKa conocido disuelto en acetonitrilo y a esta solución se le va agregando cuidadosamente el ácido cuyo pKa se quiere determinar. Conocida la concentración inicial del indicador (I_0), la concentración inicial de la β -carbolina (B_0), la concentración de la β -carbolina protonada (BH^+) y la concentración de una cualquiera de las especies del indicador, se puede determinar la constante de equilibrio entre el indicador y la β -carbolina.



$$K = [BH^+] [In] / [B] [InH] = K_{a\ InH} / K_{a\ BH^+} \quad [14]$$

Conocido el dato de pKa del indicador se puede calcular entonces el pKa de las β -carbolinas. En el caso de las β -carbolinas aromáticas este método resultó adecuado, usándose, por sus características espectroscópicas y propiedades ácido-base, el indicador rojo neutral ($C_{15}H_{17}ClN_4$, Mallinkrodt). Este indicador tiene dos intervalos de cambio de color: uno del rojo (IH^+) al amarillo (I) (pKa 15,6), y otro del azul (IH_2^{++}) al rojo (IH^+) (pKa 6,0)⁶⁶ (Figura 23A). Al agregar la β -carbolina disuelta en acetonitrilo a la solución donde estaba disuelto el indicador el equilibrio se desplazaba de la especie roja de éste hacia la amarilla. En el caso de las β -carbolinas parcialmente hidrogenadas resultó adecuado como indicador el azul de bromofenol ($C_{19}H_{10}Br_4O_5S$, Mallinkrodt), el cual también tiene dos intervalos de cambio de color: uno en el que pasa de incoloro (HI) a amarillo (I^-) (pKa 12,0)

y el otro en el que pasa de amarillo(I^-) a azul (I^{\ominus}) (pK_a 17,5)⁶⁶ (Figura 23B). Al agregar el alcaloide a la solución del indicador en acetonitrilo el equilibrio se desplazaba de la especie amarilla a la azul.

Los resultados obtenidos para las distintas β -carbolinas estudiadas se presentan en la Tabla 21.

Tabla 21 Valores de pK_a de β -carbolinas determinados en MeCN

β -Carbolina	pK_a MeCN ^(a)	Indicador	pK_a H ₂ O ^(b)	pK_a MeCN - pK_a H ₂ O
<i>nor</i> -Harmano	14,9	RN ^(c)	7,2	7,7
Harmano	15,4	RN	7,7	7,7
Harmina	15,8	RN	8,0	7,8
Harmol	15,7	RN	8,0	7,1
Harmalina	17,4	AB ^(d)	10,0	7,3
Harmalol	17,6	AB	10,0	7,6

(a) error: $\pm 0,2$ unidades de pH, (b) pK_a referencias 10, 11 y 13; (c) RN: rojo neutral; (d) AB: azul de bromofenol

Como se ve en la tabla los valores de pK_a obtenidos en acetonitrilo siguen la tendencia general observada en agua. La presencia del sustituyente donador de electrones en el anillo aromático no influye marcadamente en los valores obtenidos. Sin embargo, se observa una ligera tendencia creciente coherente con el efecto mesomérico que ejercen estos grupos (metoxilo e hidroxilo).

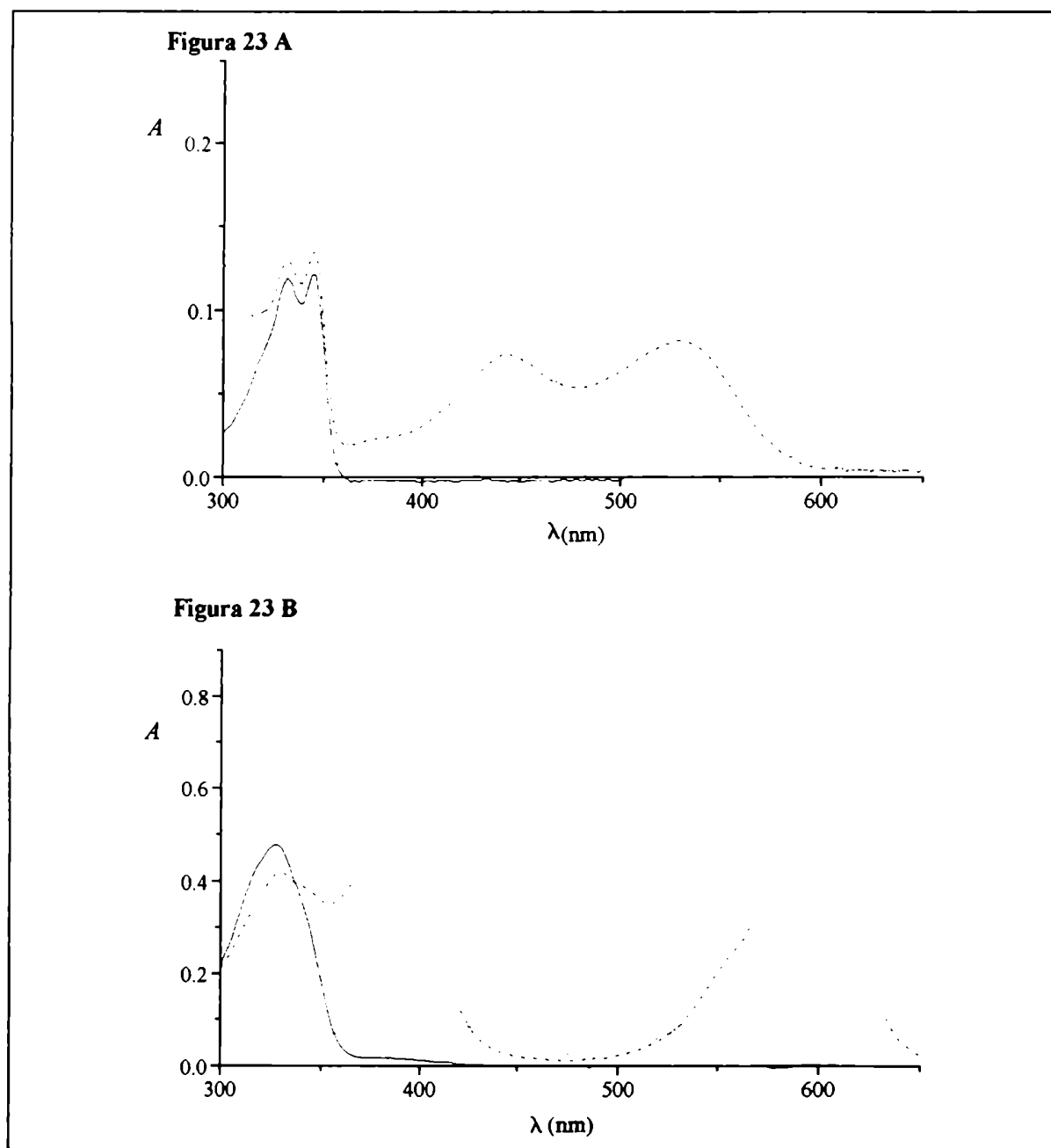


Figura 23 23A espectros de absorción en acetonitrilo de *nor-harman* $c: 2,91 \times 10^{-5}$ M (—), rojo neutral $c: 6,8 \times 10^{-6}$ M (.....), mezcla de ambos (-.-.-); 23B espectros de absorción en acetonitrilo de *harmalina* $c: 1,1 \times 10^{-5}$ M (—), azul de bromofenol $c: 1,1 \times 10^{-5}$ M (.....) y mezcla de ambos (-.-.-).

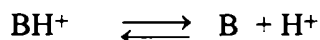
El error de estas determinaciones estaría dado por el error en la determinación del pKa del indicador (0,1 unidades de pH). El error en la determinación de las concentraciones de las distintas especies involucradas influye en la segunda cifra decimal del pKa. Por lo tanto el orden del error es de 0,1 unidades de pH.

Es interesante señalar que la diferencia entre los valores obtenidos para pKa en acetonitrilo y en agua sigue la tendencia general observada por otros autores (ver Tabla 20) para compuestos nitrogenados modelo, alifáticos y aromáticos, manteniéndose la misma para este tipo de equilibrios entre 7,5 y 7,9 unidades de pH.

Las β -carbolinas parcialmente hidrogenadas resultaron ser más básicas que las aromáticas, comportamiento similar al observado por otros autores en solución acuosa (Tabla 19). Esto podría deberse a que en el caso de la harmalina y del harmalol la densidad de carga negativa está más localizada sobre el N piridínico, de carácter imínico, que en el caso de las otras β -carbolinas donde la carga está más dispersa en el anillo aromático piridínico por mayor probabilidad de interacción de los electrones n con el sistema π (ver distribución de cargas sobre los átomos en el estado S_0 , Parte Experimental E.14, Tabla 41). Como la protonación localiza el par electrónico n y por lo tanto se produce una pérdida de energía electrónica de deslocalización en el sistema aromático⁶⁷, el proceso de protonación se ve menos favorecido en el caso de las β -carbolinas totalmente aromáticas.

Complementariamente intentamos determinar los valores de las Ka por otro método, con el doble objeto de comparar los valores obtenidos por diferentes métodos y ganar experiencia en el estudio de propiedades ácido base de compuestos nitrogenados en solventes orgánicos. Este otro método fue el propuesto por Kolthoff⁶⁸ para estudiar el comportamiento de indicadores ácido-base en medios orgánicos. En el mismo también se utiliza la espectroscopia de absorción UV-vis, como técnica para efectuar la cuantificación.

Si se tiene el siguiente equilibrio:



donde K_a resulta ser: $K_a = [\text{B}] [\text{H}^+] f_{\text{B}} f_{\text{H}^+} / [\text{BH}^+] f_{\text{BH}^+}$

y f_i el factor de actividad de la especie i ;

considerando que en soluciones suficientemente diluidas es razonable suponer que $f_{\text{H}^+} = f_{\text{BH}^+}$ y $f_{\text{B}} = 1$;

y, como es sabido, el ácido perclórico se comporta como un ácido fuerte en acetonitrilo siendo la constante de autoprotólisis de este solvente 3×10^{-27} (pKs 26,5) a 25°C⁶⁹,

entonces en dicho medio $[\text{H}^+] = C_a - [\text{BH}^+]$, donde C_a es la concentración inicial del ácido perclórico. Reemplazando y reordenando se obtiene que

$$K_a = [\text{B}] (C_a - [\text{BH}^+]) / [\text{BH}^+] \quad [15]$$

$$\log (C_a - [\text{BH}^+]) = \log ([\text{BH}^+] / [\text{B}]) - \text{p}K_a \quad [16]$$

Haciendo uso de este método se determinaron los valores de pKa de la *o*-nitroanilina, la *o*-nitro-*p*-cloroanilina y la *o*-nitrodifenilamina, siendo éstos 4,85, 3,88 y 2,01 respectivamente⁶⁸.

Al aplicar estas ecuaciones a los datos obtenidos para el *nor*-harmano y el harmano se obtuvieron rectas de pendiente cercana a 1, con los valores de pKa iguales a 6,6 y 6,2 respectivamente. Como surge de comparar estos valores con los indicados en la Tabla 21 éstos no coinciden con los obtenidos por el otro método y resultan además menores que los obtenidos en soluciones acuosas, contrariamente a lo informado para otras aminas en estos medios⁶⁴.

La divergencia de los resultados obtenidos puede explicarse teniendo en cuenta que mientras que en el caso de las nitroanilinas estudiadas por Kolthoff el valor de pKa es de alrededor de 3, en el caso de las β -carbolinas es aproximadamente 15. Entonces, en el caso

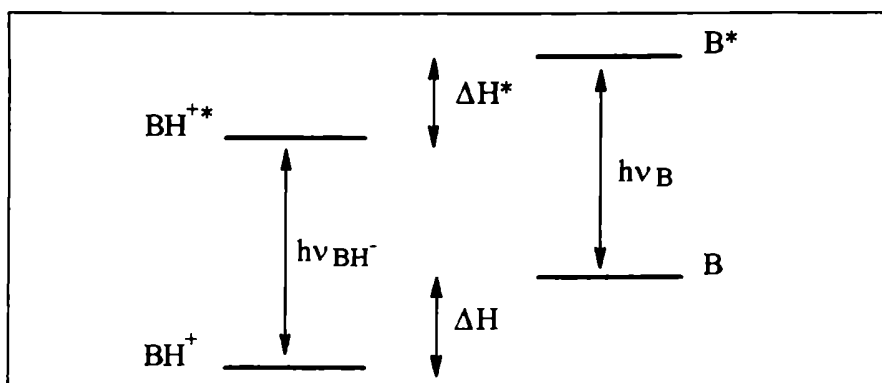
de las nitroanilinas cuando el logaritmo de la razón de la concentración de especie protonada y de la especie sin protonar varía entre -1 y 1, la concentración de $[H^+]$ varía entre 10^{-5} y 10^{-3} M; en cambio en el caso de las β -carbolinas cuando la concentración de BH^+ es similar a la de B la concentración de H^+ es del orden de 10^{-15} M. Esta concentración se determina por diferencia entre los valores de Ca y de $[BH^+]$ que en este caso son ambos del orden de 10^{-6} M. Por lo tanto no es posible determinar con precisión una K_a del orden de 10^{-15} por este método.

2.2 *Determinación de pK_a^* en acetonitrilo*

Como es sabido los valores de pK dependen de la distribución electrónica en la molécula, la cual se ve modificada en general al pasar de un estado electrónico a otro. Es lógico pensar entonces que los valores de pK en el estado electrónico excitado, pK^* , sean distintos a los valores en el estado electrónico fundamental. Considerando la regla de Kasha⁷⁰, los estados electrónicos excitados involucrados en los equilibrios ácido-base son el primer estado electrónico singulete S_1 o bien el primer estado triplete, T_1 , cuando se trabaja con técnicas en estado estacionario.

En un par ácido-base conjugado, puede darse que cada miembro del par tenga su máximo de absorción UV-vis a distinta frecuencia. Entonces si BH^+ absorbe a mayor frecuencia que B, en una solución de pH tal que sea igual al pK_a , la concentración de B será igual a la de BH^+ , pero en el estado excitado BH^+ estará en un nivel de energía mayor que B por lo cual tenderá a pasar a B. Esto es, se convierte en un ácido más fuerte. Si por el contrario B absorbe a mayor frecuencia que BH^+ , entonces B se convierte en una base más fuerte en el estado electrónico excitado⁷¹.

Estos cambios en la frecuencia de absorción que acompañan a la protonación y el cambio del valor de pK luego de la excitación se relacionan entre sí en el llamado ciclo de Förster.



Esquema 1 Ciclo de Förster

Como se ve en el Esquema 1

$$\Delta H^* - \Delta H = \Delta E_B - \Delta E_{BH^+} = Nh(\nu_B - \nu_{BH^+}) \quad [17]$$

si la entropía de reacción es equivalente en los dos estados:

$$\ln K - \ln K^* = Nh(\nu_B - \nu_{BH^+}) / RT \quad [18]$$

Cuando se define $\Delta\nu = \nu_B - \nu_{BH^+}$, es decir la diferencia de energía (en cm^{-1}) de la transición 0-0, se obtiene la siguiente expresión:

$$\Delta pK = pK^* - pK = 0,0021 \Delta\nu \quad \text{a } 298 \text{ K} \quad [19]$$

Para que la aplicación de este modelo sea razonable se requiere que³⁵:

1- La entropía de protonación sea la misma en el estado electrónico excitado y en el fundamental. Si bien la solvatación del estado fundamental es diferente a la del estado excitado la diferencia es similar en el par ácido-base conjugado.

2- La energía de la transición 0-0 pueda determinarse. La frecuencia de ésta, ν , se calcula como el promedio de los máximos de absorción y emisión para cada especie. Esto es cierto si la distribución de probabilidades de transición en absorción hacia un estado excitado vibrónico es la misma que en la emisión hacia un estado fundamental vibrónico, y la separación de los niveles vibracionales es la misma en el estado fundamental que en el excitado. Esta situación ideal se alcanza en los compuestos cuyos espectros de absorción y emisión son imágenes especulares. Se podría pensar en usar los máximos de absorción sin promediarlos con los máximos de emisión. Hacer esto supone considerar que la distribución de probabilidades de transiciones desde el estado fundamental a los estados electrónicos vibrónicos es similar en ambas especies. Aun si esta condición se alcanzara, los espectros de absorción no tienen en cuenta la diferencia de energía de estabilización de las dos especies en el estado excitado debida a efectos de solvatación. Como la distribución de carga de las dos especies es muy distinta, no es lógico suponer que los efectos de solvente sean idénticos y se cancelen en el cálculo de $\Delta\nu$.

Como todas estas condiciones se cumplen bastante bien en el caso de las β -carbolinas aromáticas, pudieron calcularse por este método los valores de pK_a^* en acetonitrilo, los cuales se muestran en la Tabla 22

Tabla 22 Valores de pK_a^* de las β -carbolinas en acetonitrilo

β -Carbolina	$pK_a^*(a)$
<i>nor</i> -Harmano	23,4
Harmano	22,7
Harmina	23,3
Harmol	22,7
Harmalina	31,4(b)
Harmalol	31,3(b)

(a) calculado a partir de $pK^* = pK + 0,0021 \Delta\nu$ donde $\Delta\nu = \nu_B - \nu_{BH^+}$ y ν es el promedio de las frecuencias máximas de absorción y emisión; (b) ν_B es el máximo de absorción ya que esta especie no emite (ver Capítulo 1).

Al comparar los datos de pK_a^* en soluciones acuosa y acetonitrilo (ver Tablas 19 y 22) se observa que así como en el estado fundamental el pK_a es mayor en acetonitrilo que en agua se mantiene este mismo comportamiento en el estado excitado.

2.3 *Determinación de ΔpK_a*

En el caso de las β -carbolinas aromáticas se calculó en el resto de los solventes orgánicos empleados en este estudio la diferencia de pK_a para cuando el equilibrio ácido-base ocurre en el estado excitado y el estado fundamental (ΔpK_a) usando para ello la ecuación de Förster. En el caso de las β -carbolinas 3,4-dihidrogenadas, como la especie neutra no tiene una banda de emisión característica, se hizo una modificación al método de Förster. Se calculó el $\Delta pK_a'$, definiéndolo de la siguiente manera: la energía de la base libre fue estimada a partir del máximo de menor energía del espectro de absorción; la energía de la molécula protonada fue estimada haciendo el promedio entre la energía del máximo de menor energía del espectro de absorción y la energía del máximo de mayor energía del espectro de emisión.

Los valores de ΔpK_a y $\Delta pK_a'$ así calculados se muestran en forma comparativa en la Tabla 23. También se calcularon ambos valores en los casos en que era posible calcular ΔpK_a para poder evaluar en forma comparativa todos los valores de $\Delta pK_a'$ incluyendo los casos donde sólo es posible calcular el $\Delta pK_a'$. Como puede verse en la Tabla 23, para las β -carbolinas aromáticas la diferencia de los valores obtenidos es del orden de 1 a 1,5 unidades de pK , pudiendo ser de este orden la diferencia entre $\Delta pK_a'$ calculado y ΔpK_a indeterminado para la harmalina y el harmalol.

TABLA 23 Valores de ΔpK_a (a) y $\Delta pK_a'$ (b)

β -Carbolina		MeOH	EtOH	i-PrOH	t-BuOH	MeCN	CH ₂ Cl ₂	H ₂ O ^(c)
nor-Harmano	ΔpK_a	7,1	6,9	7,2	7,0	8,5	8,9	5,5
	$\Delta pK_a'$	8,6	8,2	8,0	7,7	9,2	9,8	8,4
Harmano	ΔpK_a	6,2	6,2	6,4	6,2	7,3	7,7	4,9
	$\Delta pK_a'$	7,4	7,2	7,2	7,1	8,1	8,7	7,4
Harmina	ΔpK_a	6,7	6,4	6,3	6,3	7,5	8,6	4,6
	$\Delta pK_a'$	8,3	7,8	7,7	7,6	9,1	9,9	7,8
Harmol	ΔpK_a	6,6	6,6	6,6	6,5	7,6		6,6
	$\Delta pK_a'$	7,8	7,9	7,8	7,7	8,8		8,0
Harmalina	$\Delta pK_a'$	12,6	13,0	12,8	13,0	14,1	13,9	13,6
Harmalol	$\Delta pK_a'$	11,8	12,0	12,4	12,4	13,7	12,9	11,8

(a) valores calculados a partir del ciclo de Förster; (b) valores calculados según lo detallado en el texto; (c) datos tomados de las referencias 10, 11 y 13.

Los valores de ΔpK_a obtenidos en todos los casos son positivos. Esto indica que el estado electrónico excitado es más básico que el estado fundamental.

Comparando los valores de ΔpK_a y $\Delta pK_a'$ obtenidos en solventes orgánicos con los obtenidos por Tomas Vert^{10,11,13} en soluciones acuosas (Tabla 23) podemos concluir que en solventes hidroxílicos polares (solventes orgánicos con $\alpha > 0,40^{53}$, ver Tabla 17 en el Capítulo 1) los valores de ΔpK_a son menores en aproximadamente 1,5 unidades de pH que

los obtenidos en solventes orgánicos no hidroxílicos (acetonitrilo $\alpha = 0,19$, diclorometano $\alpha = 0,13^{53}$). Como era de esperar, el carácter básico se ve intensificado en mayor medida en los solventes con poca capacidad de formar puentes de hidrógeno, ya que los electrones del fluoróforo se encontrarían menos localizados y comprometidos en las interacciones con el solvente. Este tipo de unión previa competiría con la formación de la especie protonada como tal, competencia ésta que no puede darse (o es poco importante) en los solventes con valores de α bajos.

Es interesante señalar también que el incremento de basicidad de las β -carbolinas parcialmente hidrogenadas es mucho mayor que el de las aromáticas. Esto indica que la capacidad de aceptar un protón se ve mucho más modificada en las primeras al pasar al estado electrónico excitado. Esto podría deberse a que el N imínico en las primeras (piridínico en las últimas) en el estado electrónico excitado adquiere una hibridación con mayor carácter p, casi del tipo sp^3 , cosa que no ocurre en el mismo grado en las β -carbolinas aromáticas.

2.4 Determinación de pK_a por titulación fluorométrica.

Los valores obtenidos de ΔpK_a indican que cuando se observa el equilibrio entre la forma protonada y la neutra en el estado electrónico fundamental, en el estado electrónico excitado debería encontrarse todo el alcaloide en la forma protonada. Esto será válido siempre que el equilibrio ácido-base se establezca durante el tiempo de vida de la especie excitada. Este tipo de equilibrio ha sido descrito, como ya señaláramos previamente, en soluciones acuosas para el *nor*-harmano⁸, el harmano⁷ y la harmina⁶. Esto es posible porque estos alcaloides se convierten en el estado electrónico excitado en bases más fuertes que el anión hidroxilo y entonces son capaces de abstraer un protón del agua. En aquellos casos donde el H^+ debe acercarse a la base, a pesar de ser la constante de velocidad de la reacción

(k_r) del orden difusional, en general la velocidad de protonación no llega a competir con la desactivación del estado excitado involucrado. Esto es lo que ocurriría en el caso del equilibrio del harmol entre sus formas catiónica y zwitteriónica⁶ en medio acuoso: si bien está predicha la formación del catión a través de la ecuación de Förster, al hacer la titulación fluorométrica la emisión de éste no se observa a los valores de pH esperados.

En el caso de usar como solvente acetonitrilo, según los valores de ΔpK_a cuando se observan las dos especies en el estado fundamental se esperaría observar sólo la forma protonada en el estado electrónico excitado. Para corroborar esta hipótesis se realizaron los espectros de emisión del *nor*-harmol y de la harmalina en acetonitrilo con agregados de $HClO_4$ disuelto en ácido acético.

La constante de acidez en el estado electrónico excitado en soluciones diluidas se define como

$$K_a^* = [B^*] [H^+] / [BH^{+*}]$$

Se calculó $[H^+]$ a partir de los datos obtenidos del correspondiente espectro de absorción de la siguiente manera: $[H^+] = [BH^+] K_a / [B]$

A partir de los datos de absorbancia se determinó $[BH^+]$, sabiendo que $[B]_0 = [BH^+] + [B]$, se calculó $[B]$ y pK_a fue medido en este trabajo de tesis (Tabla 21).

De los espectros de emisión fluorescente se determinaron $[B^*]$ y $[BH^{+*}]$. Como se trabajó a $A < 0,1$ la intensidad de fluorescencia es proporcional a la concentración de cada especie²⁷. Definimos F como la intensidad de fluorescencia (I) a una longitud de onda tal que sólo emite la especie catiónica y F' como la intensidad de fluorescencia a una longitud de onda tal que sólo emite la especie neutra, entonces $F = k [BH^{+*}]$ y $F' = k' [B^*]$. A pH tres unidades menor que el pK_a se observa sólo la emisión de la forma catiónica con lo cual se determina k . A pH tres unidades mayor que pK_a se observa únicamente la fluorescencia de la forma neutra con lo cual se determina k' .

En el caso de la harmalina sólo se determinó $[BH^{+*}]$ y por diferencia $[B^*] = [B]_0 - [BH^{+*}]$

Otra forma de calcular el pK_a^* por titulación fluorométrica es a través de un método gráfico. Se grafica F_o/F (F_o es la I cuando se encuentra todo como catión) o F_o'/F' (F_o' es la I cuando se encuentra todo como especie neutra) en función de pH (ver Figura 24). El punto de inflexión de las curvas graficadas corresponde al valor de pK_a^* . En el caso de la harmalina (ver Figura 24B) sólo se pudo seguir la emisión del catión ya que, como ya hemos señalado, la especie neutra no fluoresce.

Los valores así obtenidos se detallan en la Tabla 24.

Tabla 24 Comparación de los valores de pK_a^* en acetonitrilo obtenidos por diferentes métodos

β -Carbolina	$pK_a^*(a)$	$pK_a^*(b)$	$pK_a^*(c)$	$pK_a^*(d)$
<i>nor</i> -Harmano	15,3	23,4	15,4	14,9
Harmalina	17,2	31,4	17,3	17,3

(a) obtenido por titulación fluorométrica, (b) calculado a partir del ciclo de Förster, (c) determinados a partir del método gráfico, (d) valores de la Tabla 21.

Como se puede ver en la Tabla 24 los valores de pK_a^* determinados por titulación fluorométrica (analítica y gráficamente) son más parecidos a los pK_a que a los pK_a^* predichos por el ciclo de Förster.

Esto se puede explicar teniendo en cuenta que, como hemos visto, el pK de autodisociación del acetonitrilo es 26,5 y los valores de pK^* de las β -carbolinas aromáticas son del orden de 24, por lo tanto éstas serían incapaces de abstraer un protón del acetonitrilo. Entonces la constante de velocidad de protonación es $k_p = k_r [H^+]$. Por lo tanto

en el mejor de los casos la k_r es del orden difusional. El valor de k_{dif} en acetonitrilo a 298 K es $2,9 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ⁷² y cuando se detectan las dos especies (neutra y catiónica) de las β -carbolinas en el estado electrónico fundamental, la concentración de protones en el medio es de aproximadamente 10^{-15} M , por lo tanto $k_p \sim 3 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$. Si comparamos este valor con el de la constante de velocidad de desactivación fluorescente k_f , que para estos compuestos es del orden de 10^8 s^{-1} , se ve claramente que en este medio el equilibrio ácido-base no tiene tiempo real para establecerse durante el tiempo de vida de las especies excitadas.

En el caso de las β -carbolinas 3,4-dihidrogenadas, según los valores de pK_a^* (aproximadamente 30) éstas serían capaces de abstraer un protón del acetonitrilo. No se disponen datos de la constante de abstracción de un H^+ del acetonitrilo, pero los valores de esta constante en agua oscilan entre 10^7 y $5 \times 10^8 \text{ s}^{-1}$ ⁵⁰. En este caso este proceso compite con procesos de desactivación no radiativos, ya sea conversión interna o cruce intersistemas, ya que no se ha detectado la fluorescencia de la especie neutra. La k_{CI} puede ser del orden de 10^{11} a 10^{13} s^{-1} ⁷³, con lo cual otra vez el equilibrio no tiene tiempo real de establecerse.

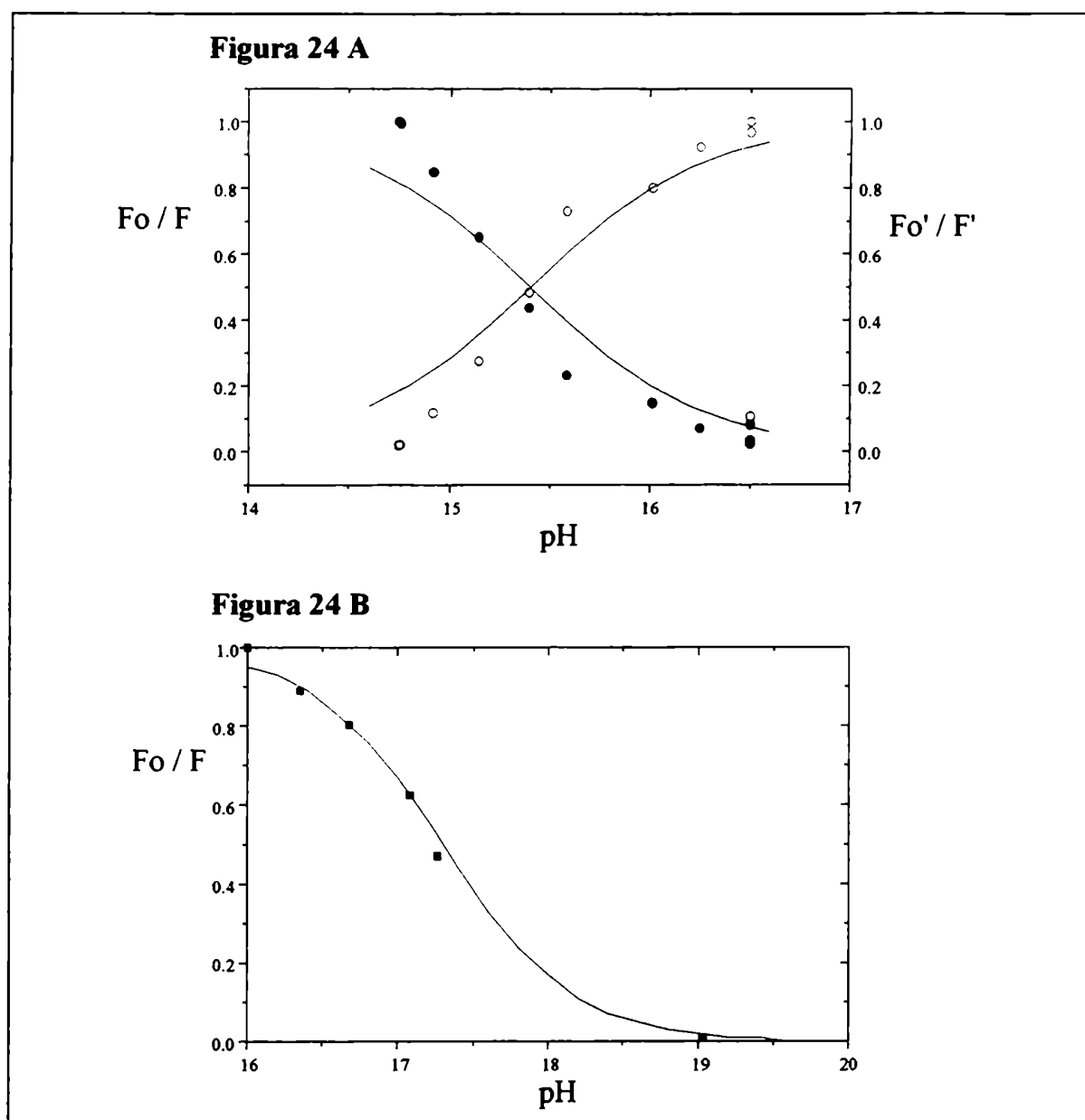


Figura 24 Titulación fluorimétrica de β -carbolinas en acetonitrilo con HClO_4 0,1M en ácido acético. **24A** *nor*-harmano λ_{exc} : 316 nm, λ_{F} (●): 480 nm, λ_{F} (○): 356 nm **24B** harmalina λ_{exc} : 400 nm, λ_{F} (■): 560 nm.

2.5 Efecto de los agentes desecantes usados en los solventes sobre los espectros electrónicos del harmalol y el harmol

Los espectros electrónicos del harmol y del harmalol realizados en los solventes purificados y secados de distinta manera (solvente AB: solvente filtrado a través de alúmina básica, solvente TM: solvente secado con tamices moleculares, solvente SD: solvente destilado, los detalles de cada una de las técnicas se describen en la Parte Experimental E.2) resultaron ligeramente diferentes según cual fuera el método empleado. (ver Tabla 25: solventes AB y TM, Tablas 4 y 14: los solventes utilizados fueron los solventes SD).

Así en el espectro de absorción del harmalol en metanol AB se observa una banda centrada a 450 nm. Un espectro similar se observó cuando se empleó metanol TM. Este máximo de absorción ubicado entre 450 y 460 nm también fue detectado en etanol AB y TM, en etilenglicol y en agua (Tabla 25).

Los espectros de emisión del harmalol en los solventes AB y TM mencionados presentaron a determinadas λ_{exc} (380 nm) una banda de emisión nueva alrededor de 540 nm (528-550 nm). También se observó esta nueva banda en los espectros de emisión realizados en agua y en etilenglicol (Tabla 25). En 2-metil-2-propanol se observó esta señal solamente en el caso del solvente AB a λ_{exc} 460 nm.

Comparando estos resultados con otros descritos en literatura^{16,20} en medios acuosos, los nuevos máximos de absorción y emisión pueden asignarse al harmalol en su forma zwitteriónica. Por ejemplo cuando se realizaron los espectros de excitación a λ_{em} = 550 y 540 nm en metanol AB y TM respectivamente, se observaron bandas muy intensas a 463 y 460 nm junto con aquellas correspondientes a la forma catiónica (390 nm) (Figura 25).

El corrimiento hipsocrómico de las bandas observado en los espectros de emisión y excitación fluorescente está de acuerdo con la modificación espectroscópica que

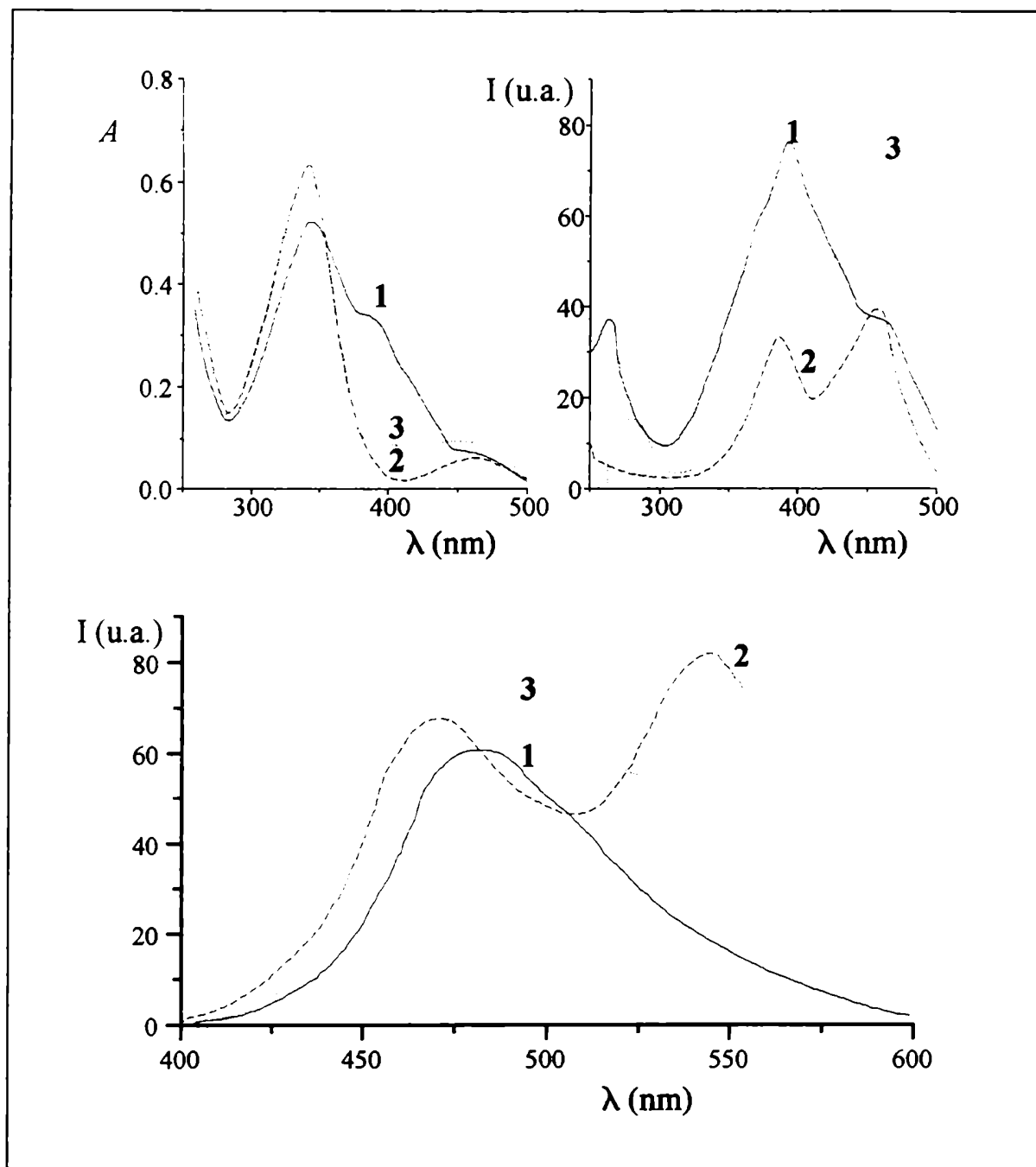


Figura 25 Espectros de absorción UV-vis, (arriba a la izquierda), excitación fluorescente (arriba a la derecha) y emisión fluorescente (abajo) (λ_{exc} : 340 nm) de **harmalol** en MeOH anhidro comercial (1, — λ_{em} : 550 nm); en MeOH TM (2, ---- λ_{em} : 540 nm); en MeOH AB (3, λ_{em} : 550 nm).

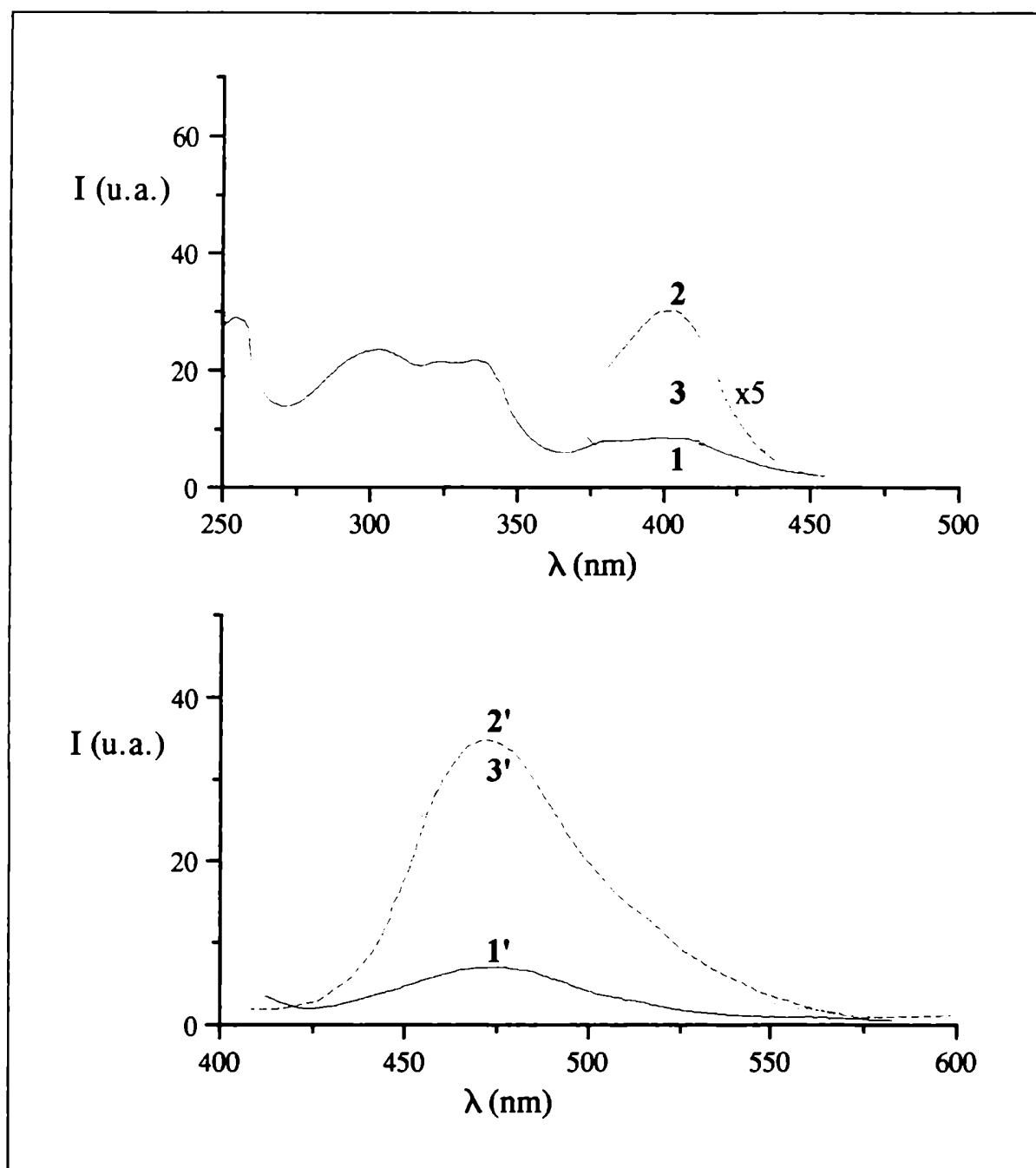


Figura 26 Espectros de excitación fluorescente (arriba) y emisión fluorescente (abajo) de **harmol** en EtOH absoluto (— λ_{em} : 480 nm 1, λ_{exc} : 400 nm 1'); en EtOH TM (----- λ_{em} : 460 nm 2, λ_{exc} : 400 nm 2'); en EtOH AB (····· λ_{em} : 480 nm 3, λ_{exc} : 400 nm 3').

acompaña normalmente a la disociación del grupo hidroxilo en hidrocarburos aromáticos⁷¹.

Es interesante notar que no se detectaron las bandas correspondientes al zwitterión cuando se utilizó 2-propanol AB y TM, y solamente se observó la fluorescencia de esta especie en 2-metil-2-propanol AB.

En el caso del harmol, el espectro de absorción no presenta modificaciones detectables cualquiera sea el tratamiento del solvente (solventes AB o TM). En cambio en su espectro de emisión fluorescente, cuando se utilizan metanol y etanol AB y TM, aparece una nueva señal entre 443 y 472 nm, (Figura 26) la que coincide con la banda asignada a la forma zwitteriónica del harmol en soluciones acuosas básicas (pH 9,5, $\lambda_{\text{max}} = 440 \text{ nm}^{13}$) y en soluciones metanólicas básicas (pH 10 y 14, $\lambda_{\text{max}} = 460 \text{ y } 465 \text{ nm}^{6}$).

Es digno de destacar que cuando se detectó la señal de emisión de la especie zwitteriónica siempre se encontró la banda de ésta en el correspondiente espectro de excitación. Esto quiere decir que existe algo del alcaloide en forma zwitteriónica en el estado fundamental aun cuando no se observen las bandas correspondientes en el espectro de absorción UV-vis. como en el caso del harmol. Por lo tanto no se puede afirmar que la especie zwitteriónica se forme exclusivamente en el estado electrónico excitado.

Como se indica en la Figura 27, la presencia de trazas de compuestos de tipo básico (B en la Figura) en las soluciones alcohólicas que provienen del contacto del alcohol con la alúmina básica (proceso de filtrado, ver Parte Experimental 2) o con los tamices moleculares (proceso de secado, ver Parte Experimental E.2) explicaría el comportamiento observado en estos medios. Como se ve en la Tabla 25, los espectros de absorción y especialmente los de emisión fluorescente del harmalol son más sensibles a la presencia de trazas de agua, impurezas ácidas o básicas que los del harmol. También la fluorescencia del harmalol resulta ser más sensible a la presencia de impurezas básicas que la de la harmalina. La presencia del grupo hidroxilo (grupo fenólico) en la estructura del harmalol y la interacción del protón fenólico del catión del harmalol con el compuesto básico B (el cual incluso puede ser el N del grupo imino de la misma molécula) en el estado fundamental y en el estado excitado

explicarían los resultados obtenidos tal cual se muestran en la Figura 27. Estos resultados sugieren también que la formación del zwitterión en el estado electrónico excitado se debería principalmente a la disociación del grupo hidroxilo del harmalol y no al equilibrio tautomérico.

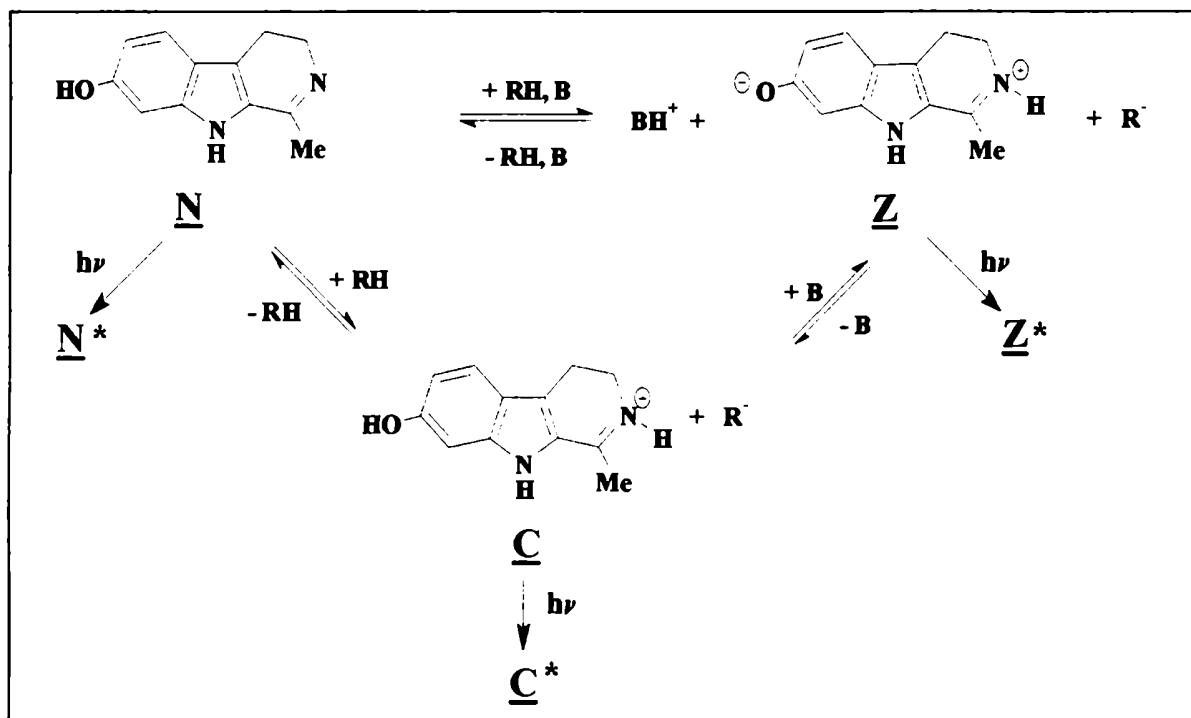


Figura 27 Equilibrios ácido-base del harmalol.

Tabla 25 Efecto de los agentes desecantes en los espectros electrónicos de absorción UV-vis. y de emisión y excitación fluorescentes del **harmalol** y del **harmol** en solventes orgánicos.

Solvente	Absorción(a)		Emisión			Excitación		
	$\lambda_{\text{máx}}$ (b)	A	λ_{exc}	$\lambda_{\text{máx}}$	I(c)	λ_{em}	$\lambda_{\text{máx}}$	I
Harmalol(d)								
MeOH AB(e)	338	0,592	280	470	16	380	-	-
	456	0,091		545	40	480	252	50
			300	462	27		388	160
				535	17	550	390	100
			340	480	36		463	175
				528(h)	28			
			380	485	130			
				530(h)	106			
MeOH TM(f)	340	0,586	280	460	15	390	-	-
	456	0,047		543	65	460	250	85
			300	461	28		390	6
				540	22	480	246	60
			340	460	38		390	10
				541	40	540	390	160
			380	460	6		460	190
				543	145			
EtOH AB	340	0,501	280	480	10	380	-	-
	400(h)	0,045		543	13	480	260	100
	450(h)	0,016	300	476	6		390	500
				540	4	540	260	50
			330	478	18		391	200
			340	479	29		468	150
			380	480	146			
			470	545	60			
EtOH TM	340	0,489	280	480	3	380	-	-
	466	0,017		550	5	480	260	7
			300	-	-		394	43
			340	480	6	550	260	5
			380	480	33		394	18

Tabla 25 Continuación

			548(h)	15		467	33
			470	547	32		
t-BuOH AB	340	0,516	280	478	12	380	-
				546	6	480	260
			300	478	6		391
			340	475	45	540	260
			380	478	210		392
			460	478	8		475
				550	20		
t-BuOH TM	340	0,565	280	476	6	380	-
			300	474	3	480	265
			340	476	12		393
			380	474	92		
			470	-	-		
EG(g)	340	0,418	280	470	20	370	-
	450	0,248		540	90	390	-
			300	470	44	410	-
				540	44	480	244
			330	470	49		387
				540	49	540	280
			390	470(h)	70		390(h)
				537	190		452
			450	541	370		
EG + AS(h)	380	0,805	280	479	156	380	-
			300	467	65	480	262
			340	475	600		360
			460	476	60		391
						540	262
							360
							390
H ₂ O	372	0,502	280	531	110	380	-
	450(h)	0,219	300	425(h)	26	470	258
				480(h)	38		362(h)
				519	44		386
			340	429	240	530	258
			380	496	330		362(h)
			430	533	360		400
							432

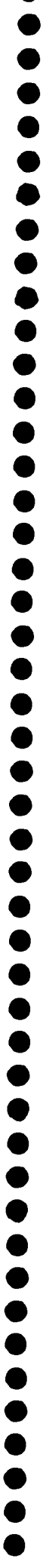
Tabla 25 Continuación

Solvente	Absorción		Emisión			Excitación		
	$\lambda_{\text{máx}}$	$\log(\epsilon)$	λ_{exc}	$\lambda_{\text{máx}}$	I	λ_{em}	$\lambda_{\text{máx}}$	I
Harmol(i)								
MeOH AB	302	4,26	280	351(h)	200	380	258	320
	324(h)	3,87		365	260		300	300
	338	3,77		410(h)	130		324	240
				456	90		336	220
			300	351(h)	320	420	258	210
				365	420		300	190
				410(h)	220		324	160
				456(h)	140		336	140
			330	351(h)	220	460	255	160
				366	310		300	145
				410(h)	160		324	130
				456	130		336	128
			380	460	14		390	18
MeOH TM	304	4,17	280	353(h)	150	380	254	260
	326	3,90		365	210		300	260
	338	3,86		454	110		324(h)	190
			300	353(h)	260		338	170
				366	390	420	254	200
				410(h)	200		300	200
				454	160		324(h)	140
			330	353	160		338	125
				365	230	460	254	240
				454	230		300(h)	170
			390	465	19		334	250
							390	25
EtOH AB	304	4,20	280	353(h)	325	380	253	600
	324	3,81		366	370		300	530
	338	3,69		462	20		322	390
			300	353(h)	630		334	340
				366	690	420	253	112
				462	30		300	100
			330	353(h)	400		322	76
				365	540		334	66
				462	30	480	253	30
			380	467	6		305	24
							327	21

Tabla 25 Continuación

					338	21		
					396	10		
EtOH TM	304	4,13	280	352	250	380	254	540
	324	3,69		365	320		302	570
	338	3,54	300	352(h)	650		324(h)	410
				365	850		338	350
			330	352	440	420	255	75
				366	550		302	76
			380	430	2		324(h)	57
				472	4		338	51
			400	472	7	460	256	11
							301	9
							324(h)	9
							338	10
							402	6
EG(g)	304	4,23	280	370	150	380	258	240
	328	3,96		415	200		300	250
	338	3,89		455(h)	150		324	170
			300	370	260		338	155
				414	350	420	258	460
				455(h)	250		296(h)	340
			330	370	170		306(h)	360
				418	430		327	410
			380	443	68		365(h)	150
						460	258	300
							300	260
							326	250
							338	240
							365(h)	100
EG +AS	328	4,33	280	419	170	380	262	740
	370(h)	3,83	300	418	440		328	750
			330	418	750	420	264	58
							326	60

(a) *A*, absorbancia, está indicada cuando absorbe tanto la forma neutra como la catiónica y/o zwitteriónica; (b) λ en nm; (c) *I*, intensidad relativa de emisión; (d) concentración: $3,9 \times 10^{-5}$ M; (e) AB: solvente filtrado a través de una columna de cromatografía rellena con alúmina básica; (f) TM: solvente secado sobre tamices moleculares; (g) EG: etilenglicol; (h) AS, con 1% de ácido sulfúrico 0,5 M; (i) concentración: $3,9 \times 10^{-5}$ M.



Conclusiones

En resumen, a lo largo de este capítulo hemos visto como ha sido posible determinar, mediante métodos espectroscópicos, debido a las características de absorción y emisión de las β -carbolinas e indicadores utilizados, las constantes de acidez del equilibrio β -carbolina neutra-protonada, tanto en el estado electrónico fundamental como en el primer estado electrónico excitado singulete, usando como solvente acetonitrilo. Como en el caso de los espectros electrónicos, la única información que se encontraba en literatura respecto de las constantes de acidez de estos alcaloides era la correspondiente al medio acuoso. Por primera vez han sido determinadas éstas en un solvente orgánico, como es el acetonitrilo. Los valores de pK_a obtenidos en acetonitrilo resultaron mayores que los obtenidos en agua. Esto indica que las β -carbolinas son más básicas en este medio orgánico, comportamiento que era de esperar. Además, las β -carbolinas 3,4-dihidrogenadas resultaron más básicas que las aromáticas. Esto se explica, como ya dijimos antes, teniendo en cuenta la mayor localización de la carga en las primeras debido a la pérdida de aromaticidad y consecuente menor deslocalización de la carga respecto de las últimas.

También por primera vez se usó el ciclo de Förster para determinar la diferencia de pK_a entre los estados electrónicos fundamental y excitado singulete en diversos solventes orgánicos.

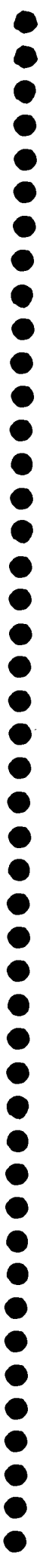
Mediante una titulación fluorométrica se pudo determinar que al menos en acetonitrilo el equilibrio ácido-base predicho por el ciclo de Förster no llega a establecerse durante el tiempo de vida de la especie fluorescente.

El equilibrio ácido-base que involucra al H del grupo hidroxilo del harmol y del harmalol ha sido estudiado en forma cualitativa. En principio la β -carbolina parcialmente hidrogenada sería más ácida que la totalmente aromática, resultado que se explica también considerando la capacidad de deslocalizar una carga del compuesto totalmente aromático respecto del análogo parcialmente hidrogenado. Cabe señalar que muchas veces no se tiene

en cuenta el tratamiento de purificación y secado del solvente y, como en este caso, puede dar origen a diferencias en los espectros electrónicos, que resultan importantes en el caso de usar éstos como método de cuantificación. Dadas estas propiedades, el harmalol y la harmalina podrían usarse como sensores simples de la presencia de restos de agentes de secado básicos o ácidos en solventes orgánicos.

CAPÍTULO 3

INTERACCIÓN ENTRE β -CARBOLINAS AROMÁTICAS Y COMPUESTOS HALOGENADOS



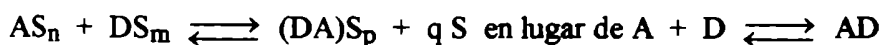
3.1 Interacción entre β -carbolinas aromáticas y compuestos halogenados en el estado fundamental

Dado que se había observado cierta fotorreactividad de las β -carbolinas aromáticas tanto en CH_2Cl_2 ⁷⁴ como en CHCl_3 ⁷⁵ y en mezclas de etanol- CCl_4 ⁷⁶, se realizó el estudio de la posible interacción que pudiera dar lugar a la formación de un complejo de transferencia de carga (CTC) entre estos alcaloides y distintos compuestos halogenados en el estado electrónico fundamental, haciendo uso de la espectroscopía de absorción UV-vis.

Entre los numerosos trabajos descriptos en la literatura relacionados con el estudio de la formación de CTC en el estado electrónico fundamental⁷⁷ es interesante destacar algunos de aquéllos en los que participan aminas y halometanos. En 1957 se describió⁷⁸ la especial interacción entre bases nitrogenadas y CCl_4 . Al exponer a la luz del laboratorio soluciones de trietilamina, 2-dietilaminoetanol, bencilamina, ciclohexilamina y N,N-dimetilanilina en CCl_4 se observó la aparición de los correspondientes clorhidratos. Si bien estos autores describieron la reacción como sensibilizada por la luz no profundizaron el estudio de este fenómeno desde el punto de vista mecanístico. En 1962 Stevenson y Coppinger⁷⁹ también informaron acerca de la formación de complejos entre aminas y halometanos en el estado fundamental. Por medio de los espectros de absorción UV-vis. de soluciones de trietilamina en isooctano a las que se agregaba 1) CHCl_3 , 2) CFCl_3 , 3) CCl_4 y 4) CBrCl_3 , detectaron una nueva banda a mayor longitud de onda, la que no correspondía a ninguna de las especies por separado y que fue atribuida a la formación de un CTC del tipo 1:1 o complejos del tipo de pares iónicos de contacto. Estos autores hicieron un cálculo aproximado de la K de equilibrio correspondiente, la que resultó ser pequeña (0,09 a 0,06). El resultado importante que merece destacarse es que la nueva banda observada en el caso de las soluciones a las que se agregaba CCl_4 y CBrCl_3 aparece por encima de los 300 nm. Este hecho explicaría la conocida inestabilidad de soluciones de aminas alifáticas y alcaloides en CCl_4 , cuando las mismas quedan expuestas simplemente a la luz del laboratorio⁷⁸. Estos autores⁷⁹ también

observaron la aparición de un precipitado blanco cuando las soluciones no se protegían de la luz, siendo identificados los precipitados, por medio de sus espectros IR, como los correspondientes clorhidratos. En estas soluciones también se detectó CHCl_3 en cantidades equivalentes a las del clorhidrato, y en aquellos casos en que se usó CBrCl_3 se encontró el bromohidrato correspondiente y CHCl_3 . Este tipo de experiencias se realizaron con trimetilamina, di-*n*-propilamina y tri-*n*-propilamina. El conjunto de resultados obtenidos se podría explicar suponiendo que 1) en el CTC luego de la absorción de luz se produzca la transferencia de un electrón desde la amina al halometano de modo que el CTC se disocie para dar $\text{B}^+\text{X}^- + \cdot\text{CCl}_3$. Luego el radical triclorometilo abstraería un hidrógeno para dar CHCl_3 o iniciaría una reacción en cadena y el haluro de trialquil amonio se estabilizaría por pérdida de hidrógeno formando el alqueno correspondiente. 2) Otra posibilidad es que por absorción de luz el CTC se disocie para dar la alquenil amina, CHCl_3 y haluro de hidrógeno por un proceso no radicalario.

En 1967 Davis y Farmer⁸⁰ informaron acerca de la formación de complejos entre aminas aromáticas y halometanos. Estos autores estudiaron por espectroscopía de absorción UV-vis. las soluciones de N,N-dimetilanilina y N,N,N,N'-tetrametil-*p*-fenilendiamina en hexano con agregados de CCl_4 , CHCl_3 y CH_2Cl_2 . Para estos sistemas, usando la ecuación de Benesi Hildebrand⁴², calcularon los valores de K para la formación de los complejos, obteniendo valores muy pequeños e incluso en algunos casos la ordenada al origen resultó tener un valor cercano a cero o negativo. Frente a estos resultados la explicación ofrecida por los autores es que, o bien se forma un complejo del tipo de transferencia de carga de contacto débil, o bien la K verdadera se ve enmascarada por la competencia con la asociación de cada componente del complejo con el solvente, siendo el equilibrio real del tipo:



donde A, D, S representan a las moléculas de aceptor, donador y solvente respectivamente y n , m y p son el número de moléculas de S asociadas a cada especie, siendo $n + m - p = q$. En conclusión, la posición de la banda del CTC y el valor pequeño de K indicaron que tanto el CHCl_3 como el CCl_4 serían en este caso aceptores de electrones débiles. La inestabilidad mostrada por las soluciones fue explicada por la descomposición del CTC electrónicamente excitado. Como en éstas detectaron la presencia de CHCl_3 los autores supusieron que el radical $\cdot\text{CCl}_3$ formado es capaz de abstraer un hidrógeno de la amina, formándose así una amina insaturada o un compuesto polimérico, si bien no realizaron un estudio detallado de todos los productos formados.

Por otro lado al estudiar en nuestro laboratorio el comportamiento fotoquímico de aminas primarias, secundarias y terciarias en CH_2Cl_2 y CCl_4 ⁸¹ y $(\text{CH}_2\text{Cl})_2$ ⁸² sólo se observó la aparición de nuevas señales en el espectro de absorción UV-vis, en el caso de las mezclas de amina- CH_2Cl_2 1:1 (v:v) y especialmente en el caso de amina- CCl_4 1:1 (v:v), realizándose el análisis de los productos obtenidos en los diferentes medios, el cual será comentado más adelante.

Un ejemplo típico de la formación de un CTC y aparición de dos bandas nuevas en el espectro de absorción UV-vis, es el caso del tetracianoetileno y el naftaleno (y sus derivados) en soluciones de CH_2Cl_2 ^{83,84}, tratándose de uno de los ejemplos más estudiados.

En nuestras condiciones experimentales cuando se hicieron los espectros de absorción UV-vis de las β -carbolinas aromáticas (concentración *ca.* 5×10^{-5} M) en solventes tales como etanol, 2-propanol y acetonitrilo en presencia de CHBr_3 (concentración entre 10^{-3} y 10^{-2} M) y de CBr_4 (concentración entre 5×10^{-5} y $1,5 \times 10^{-3}$ M) se observó la aparición de dos bandas nuevas que no correspondían a ninguna de las dos especies componentes de la mezcla por separado, como se muestra un ejemplo en la Figura 28. Este comportamiento nos llevó a pensar en un primer momento en la posible formación de un complejo de transferencia de carga (CTC).

Como es sabido, una molécula A puede interaccionar con otra molécula B, ambas en el estado electrónico fundamental, para formar un aducto conocido como complejo de transferencia de carga (CTC). Este sistema se representa con el siguiente equilibrio:



Trabajando en soluciones suficientemente diluidas la constante de asociación se define:

$$K = [AB_n]/[A][B]^n$$

si $[A]_0$ es la concentración inicial de A, $[B]_0$ es la concentración inicial de B, $[AB_n]$ es la concentración del complejo formado, entonces

$$= [AB_n] / ([A]_0 - [AB_n])([B]_0 - [AB_n])^n \quad [21]$$

si $[B]_0 \gg [A]_0$, entonces $[B]_0 - [AB_n] \sim [B]_0$

si la absorbancia de la solución se mide a una longitud de onda tal que la única especie que absorbe es el complejo, aquella será: $A = \epsilon l [AB_n]$, donde ϵ es el coeficiente de absorción molar del complejo a esa longitud de onda. Reemplazando en la ecuación [21], resulta:

$$K = A / ([A]_0 \epsilon - A) [B]_0^n \quad [22]$$

donde n generalmente es igual a 1. En este caso la relación entre K, ϵ y A se puede escribir de otra forma:

$$[A]_0 / A = 1 / K \epsilon [B]_0 + 1 / \epsilon, \text{ ecuación de Benesi Hildebrand}^{42} \quad [23]$$

en el caso donde $[A]_0 \sim [B]_0$ la ecuación queda de la forma

$$[A]_0 [B]_0 / A ([A]_0 + [B]_0) = 1 / K \epsilon ([A]_0 + [B]_0) + 1 / \epsilon \quad [24]$$

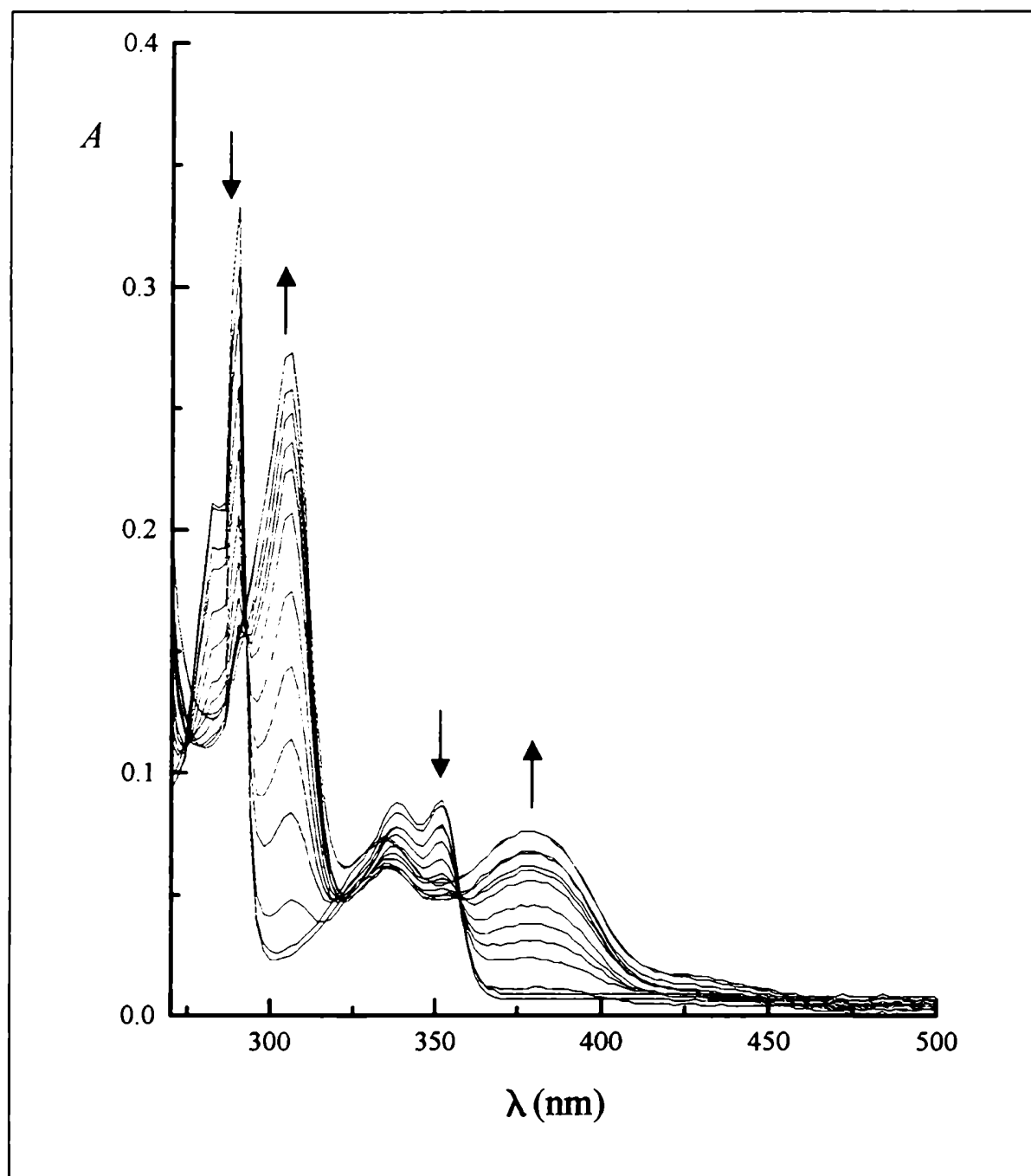


Figura 28 Espectros de absorción del *nor-harmano* en i-PrOH ($c: 1,75 \times 10^{-5}$ M) con agregados crecientes de CBr₄ [CBr₄] $\times 10^4$: 0; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 7,0; 8,0; 9,0; 10,0; 11,0; 13,0; 14,0 M.

La aparición de una nueva banda en el espectro UV-vis. por sí sola no es una prueba suficiente de la formación del complejo, sino que a partir de ésta, usando alguna de las ecuaciones antes mencionadas debe encontrarse experimentalmente un valor finito y constante para K y un valor finito para ε . Los valores de constantes de equilibrio obtenidos son confiables sólo si la concentración del complejo que se alcanza en el equilibrio es del mismo orden que la del más diluido de los componentes⁸⁵.

Para investigar la posible existencia de un CTC se hizo uso de la ecuación de Benesi Hildebrand a dos longitudes de onda diferentes, correspondientes éstas a los máximos de las dos bandas nuevas. Los valores obtenidos para K diferían considerablemente. Para encontrar alguna explicación a esta diferencia se decidió hacer un tratamiento matemático de los datos más completo. Para ello se realizó un tratamiento de datos quimiométrico, de manera tal de utilizar todos los datos de absorbancia dentro del rango de longitudes de onda estudiado de todos los espectros realizados en una experiencia, en forma similar a la descrita en el Capítulo 1 para la formación de los complejos de β -carbolina-ROH.

Para poder utilizar el programa computacional los datos de los espectros deben presentarse en forma de una matriz incluida en una planilla de cálculo. Una vez preparados los datos de manera conveniente se procedió a hacer el análisis factorial y a calcular los espectros de las dos especies que absorben involucradas en el equilibrio. A modo de ejemplo detallaremos los datos obtenidos en el caso del *nor*-harmano disuelto en 2-propanol con agregados de CBr_4 (alícuotas de solución de CBr_4 en ciclohexano de manera tal que la concentración de éste se incrementaba en 1×10^{-4} M por cada agregado en el rango de 1×10^{-4} a $1,5 \times 10^{-3}$ M, siendo el volumen total agregado despreciable frente al volumen total en la cubeta). Se tuvo la precaución de restarle a cada espectro el correspondiente de CBr_4 a esa misma concentración, trabajando con tres concentraciones de alcaloide distintas: $1,75 \times 10^{-5}$ M, $3,50 \times 10^{-5}$ M y $5,00 \times 10^{-5}$ M. Los espectros obtenidos, a modo de ejemplo, para la menor concentración de alcaloide se pueden ver en la Figura 28. Los valores de $\log(K)$ obtenidos

fueron 2,61, 2,08 y 2,84, respectivamente. Además, al calcular los valores de ϵ para la especie neutra a $\lambda = 289$ nm, estos resultaron ser $2,32 \times 10^4$, $2,41 \times 10^4$ y $2,19 \times 10^4$ M⁻¹ cm⁻¹ y para la especie nueva formada a $\lambda = 305$ nm, $4,17 \times 10^4$, $1,20 \times 10^5$ y $3,78 \times 10^4$ M⁻¹ cm⁻¹. Como se observa, los valores de K difieren entre sí y los valores de ϵ para la especie nueva formada también difieren entre sí. Además los valores de ϵ para la especie neutra, que pueden ser calculados a partir de los espectros de absorción sin agregado de quencher, no coinciden con éste ($1,7 \times 10^4$ M⁻¹ cm⁻¹). Experiencias análogas se realizaron con *nor*-harmano, harmano y harmina en acetonitrilo y 2-propanol con agregado de CHBr₃ y CBr₄, obteniéndose resultados similares.

Además de la falta de valores finitos y constantes para K y ϵ , otro hecho que no respaldaba la hipótesis de la formación de un CTC, era que la posición de las bandas del probable CTC no dependían del aceptor utilizado, cuando es sabido que existe una relación directa entre la energía de las bandas del CTC con el potencial de reducción del aceptor⁷⁷.

Para encontrar una explicación a la presencia de estas dos bandas nuevas, teniendo en cuenta la similitud de éstas con las de los espectros obtenidos en solución etanólica ácida (ver Figura 3A, 3B y 3C, Capítulo 1), se decidió medir el pH resultante de diluir 1,0 ml de la solución de CHBr₃ 1M en ciclohexano o de la solución de CBr₄ 0,1M en ciclohexano en 10 ml de agua. En ambos casos éste resultó ser ácido, dependiendo su valor del tiempo que había transcurrido desde la preparación de la solución. Los valores oscilaron entre 5,9 y 4,4. Es decir tanto el CHBr₃ como el CBr₄ se descomponen por vía térmica para dar productos que se comportan como ácido. Es decir que se realizó una titulación ácido base de la β -carbolina pero sin saber exactamente qué ácido era el titulante (probablemente, HBr), y cuál era su concentración real en la solución del solvente orgánico, ya que el pH se midió en soluciones acuosas, y además éste varía con el tiempo. Cabe señalar que cuando se realizaron los espectros con solución de CBr₄ preparada en el instante previo a la medición

no se observaron las señales nuevas durante los primeros espectros. En los últimos ya había indicios de la descomposición de la solución de CBr_4 , al aparecer las señales nuevas correspondientes a la forma protonada en el espectro de absorción.

Cabe señalar que no se observaron cambios en el espectro de absorción UV-vis de los alcaloides al agregar otros halometanos como CH_2Cl_2 , CHCl_3 , CCl_4 , CH_2Br_2 y $\text{CH}_2\text{BrCH}_2\text{Br}$ tanto en soluciones en acetonitrilo como en 2-propanol.

3.2 Interacción entre β -carbolinas aromáticas en el estado electrónico excitado singulete y compuestos halogenados en el estado fundamental.

En forma paralela al estudio de la reacción fotoquímica en sí misma, así como investigamos si había alguna interacción entre las β -carbolinas y los halometanos en el estado electrónico fundamental haciendo uso de la espectroscopía de absorción UV-vis, hicimos un estudio análogo para las β -carbolinas en el estado electrónico excitado singulete usando espectroscopía de emisión fluorescente.

Así, observamos que se producía una disminución de la intensidad de emisión fluorescente de las β -carbolinas disueltas en distintos solventes (etanol, 2-propanol y acetonitrilo) por el agregado a la solución del compuesto halogenado (CH_2Cl_2 , CHCl_3 , CCl_4 , $\text{CH}_2\text{BrCH}_2\text{Br}$, CH_2Br_2 , CHBr_3 y CBr_4).

Esta disminución de la intensidad de emisión fluorescente por agregado de un dado compuesto (fenómeno conocido como quenching) puede deberse a procesos de tipo estático o dinámico. En el primer caso la concentración de moléculas de fluoróforo disminuye debido a la formación de un complejo entre el fluoróforo y el quencher ambos en el estado electrónico fundamental. En el caso del quenching dinámico o colisional el quencher debe difundir hasta el fluoróforo durante el tiempo de vida de fluorescencia de éste. Luego del contacto, el fluoróforo se desactiva por vías distintas a la emisión fluorescente.

Si se relaciona la razón de la intensidad fluorescente sin agregado de quencher sobre la intensidad fluorescente con agregado de quencher (I_0/I) con la concentración de quencher ($[Q]$) se obtiene en ambos tipos de quenching la siguiente expresión:

$$I_0 / I = 1 + K [Q] \quad [25]$$

donde en el caso del quenching estático $K = K_E$, es la constante de formación del complejo entre el fluoróforo y el quencher en el estado electrónico fundamental

y en el caso del quenching dinámico $K = K_{sv} = k_q \tau$, donde k_q es la constante de velocidad de quenching y τ es el tiempo de vida medio de fluorescencia del fluoróforo, y K_{sv} es conocida como constante de Stern-Volmer.

Si se tienen ambos tipos de quenching simultáneamente, la expresión es:

$$I_0/I = 1 + (K_{sv} + K_E) [Q] + K_{sv} K_E [Q]^2 \quad [26]$$

Experimentalmente el quenching dinámico del estático se diferencia fácilmente si se grafica τ_0/τ en función de $[Q]$, ya que en el caso del quenching estático el τ no se modifica por la presencia de quencher por lo que $\tau_0/\tau = 1$ para toda concentración de quencher, mientras que en el caso del quenching dinámico τ disminuye proporcionalmente a $[Q]$ en forma similar a I , con lo cual se obtiene una recta de pendiente igual a K_{sv} . En nuestro caso por limitaciones del instrumental disponible, no pudimos medir los τ para distintas concentraciones de quencher.

Otra evidencia del quenching estático es la aparición de una nueva señal, ya sea en el espectro de absorción o de excitación fluorescente, debida al complejo formado (CTC).

Al realizar el estudio de la disminución de la intensidad de la fluorescencia por el agregado de pequeñas porciones de los quenchers (concentración del quencher entre 10^{-5} y 10^{-2} M, aproximadamente; concentración de la β -carbolina alrededor de 10^{-5} M, atmósfera de aire) se obtuvieron en todos los casos rectas al graficar la intensidad de fluorescencia en función de la concentración de quencher. Estos resultados no cambiaron al realizar las mismas experiencias bajo atmósfera de nitrógeno. Como ya señalamos en la sección anterior no hay evidencias de que se forme un CTC entre las β -carbolinas y los halometanos en los solventes utilizados, por lo tanto el quenching en este caso sería de tipo dinámico.

Los τ medidos en este trabajo de tesis en distintos solventes orgánicos se muestran en la Tabla 26. Como se ve en dicha tabla los valores obtenidos en los dos alcoholes utilizados son similares. Por lo tanto hemos utilizado el valor obtenido en etanol para hacer los cálculos cuando este fue el solvente utilizado, así como cuando se usó 2-propanol y acetonitrilo. En la Tabla 27 se presentan los valores de las constantes K_{sv} obtenidos a partir

de las pendientes luego de realizar una regresión lineal por cuadrados mínimos de los datos experimentales y en la Figura 29 se muestran algunos ejemplos de las rectas obtenidas. A partir de estos datos (K_{sv}), conociendo los tiempos de vida medio de fluorescencia τ de las β -carbolinas, se calcularon los valores de k_q , los que se detallan también en la Tabla 27.

TABLA 26 Tiempos de vida media de fluorescencia (τ) de las β -carbolinas aromáticas^(a)

Solvente	<i>nor</i> -Harmano	Harmano	Harmina
EtOH	5,1	4,9	5,0
t-BuOH	5,0	4,7	5,4
CH ₂ Cl ₂	2,9	2,7	3,8

(a) Los τ (en ns) fueron medidos según lo detallado en la Parte Experimental E.5.3.

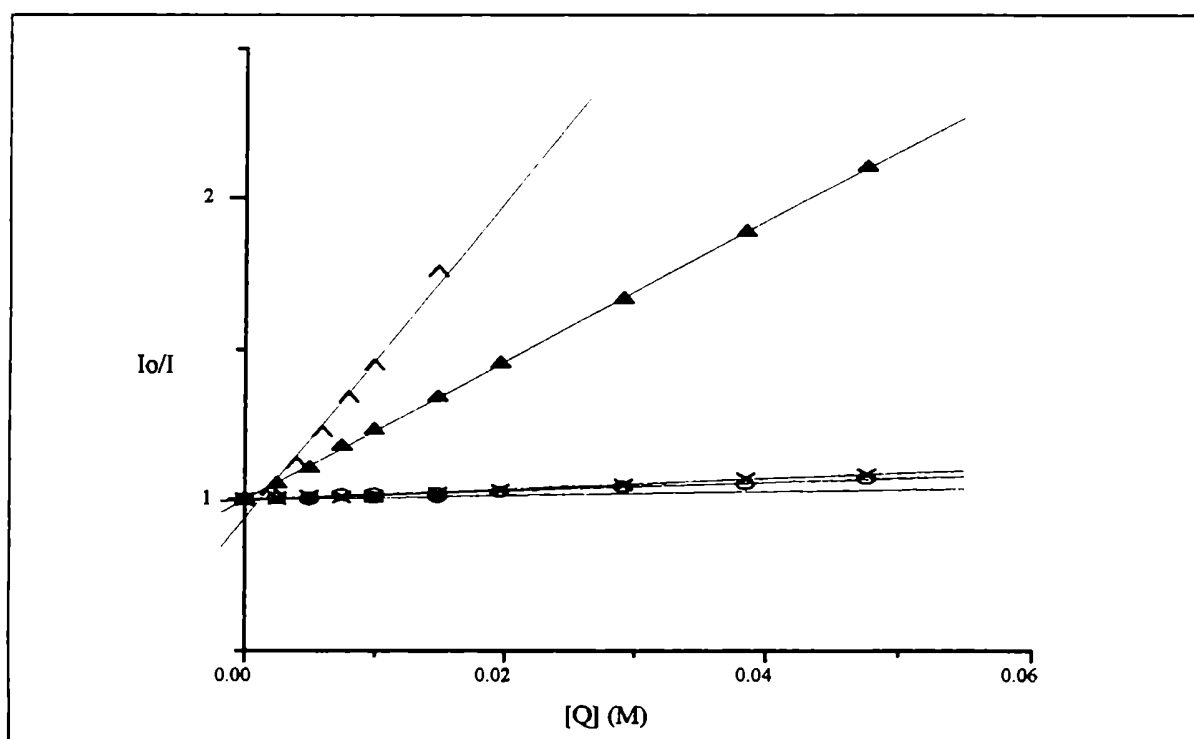


Figura 29 Gráficos de Stern-Volmer. *nor*-Harmano en MeCN (c : $ca\ 3 \times 10^{-5}$ M), $[Q]$: (●) CHCl₃, (○) CH₂BrCH₂Br, (X) CH₂Br₂, (▲) CCl₄, (∧) CHBr₃; λ_{exc} 336 nm, T 298 K. Las correspondientes rectas fueron obtenidas a partir de una regresión lineal por cuadrados mínimos.

Tabla 27 Valores de K_{sv} y k_q para el *nor*-harmano, el harmano y la harmina en distintos solventes(a)

Quencher	EtOH		i-PrOH		MeCN	
	K_{sv} (M ⁻¹)	k_q $\times 10^{-9}$ (M ⁻¹ s ⁻¹)	K_{sv} (M ⁻¹)	k_q $\times 10^{-9}$ (M ⁻¹ s ⁻¹)	K_{sv} (M ⁻¹)	k_q $\times 10^{-9}$ (M ⁻¹ s ⁻¹)
<i>nor</i>-Harmeno						
CH ₂ Cl ₂	0,069	0,0135	0,071	0,0139	0,04	0,00784
CHCl ₃	5,5	1,08	0,93	0,182	0,69	0,135
CH ₂ BrCH ₂ Br	8,7	1,71	5,0	0,98	1,47	0,288
CH ₂ Br ₂	9,2	1,80	4,1	0,80	1,86	0,365
CCl ₄	15,3	3,00	7,9	1,55	23,2	4,55
CHBr ₃	30,0	5,88	25,0	4,90	48,0	9,41
CBr ₄	142	27,8	160	31,4	175	34,3
Harmeno						
CH ₂ Cl ₂	0,06	0,0122	0,059	0,0120	0,013	0,00265
CHCl ₃	2,0	0,408	1,0	0,204	0,56	0,114
CH ₂ BrCH ₂ Br	7,0	1,43	3,9	0,796	0,94	0,192
CH ₂ Br ₂	7,4	1,50	3,9	0,796	1,67	0,341
CCl ₄	11,2	2,29	5,3	1,08	17,2	3,50
CHBr ₃	19,0	3,88	-	-	56,0	11,4
CBr ₄	108	22,0	151	30,8	197	40,2

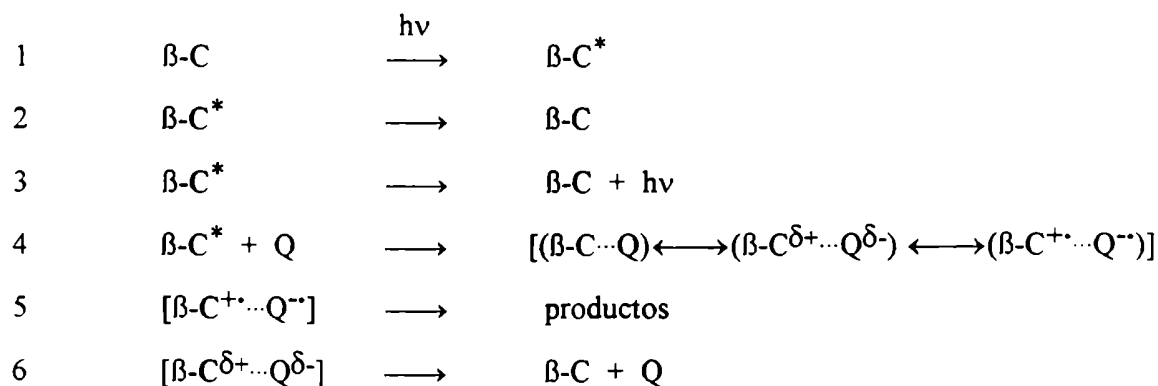
Tabla 27 Continuación

Harmina	Quencher	EtOH		i-PrOH		MeCN	
		K _{sv} (M ⁻¹)	k _q x10 ⁻⁹ (M ⁻¹ s ⁻¹)	K _{sv} (M ⁻¹)	k _q x10 ⁻⁹ (M ⁻¹ s ⁻¹)	K _{sv} (M ⁻¹)	k _q x10 ⁻⁹ (M ⁻¹ s ⁻¹)
	CH ₂ Cl ₂	0,04	0,0080	0,04	0,0080	0,04	0,0080
	CHCl ₃	7,0	1,40	1,11	0,222	0,15	0,030
	CH ₂ BrCH ₂ Br	7,4	1,48	2,6	0,520	1,07	0,214
	CH ₂ Br ₂	12,5	2,50	2,8	0,560	1,54	0,308
	CCl ₄	20,0	4,00	15,2	3,04	50,0	10,0
	CHBr ₃	22,5	4,50	-	-	95,0	19,0
	CBr ₄	220	44,0	210	42,0	360	72,0

(a) k_{diff} x10⁻⁹ (M⁻¹ s⁻¹) a 298 K: EtOH: 9,2; i-PrOH: 4,5; MeCN: 29; mediciones realizadas a temperatura ambiente (298 K), concentración de la β -carbolina ca. 5x10⁻⁵ M; rango de concentración del quencher: CH₂Cl₂: 0,1 a 0,7 M, CBr₄: 5x10⁻⁵ a 5x10⁻⁴ M; el resto: 5x10⁻³ a 3x10⁻² M; λ_{exc} : 336 nm; λ_{em} : en EtOH: 377 nm, en i-PrOH: 377 nm, en MeCN: 371 nm; harmano: λ_{em} : en EtOH: 374 nm, en i-PrOH: 374 nm, en MeCN: 367 nm; harmina: λ_{em} : en EtOH: 366 nm, en i-PrOH: 367 nm, en MeCN: 361 nm.

Este comportamiento podría explicarse según el siguiente esquema de reacción

ESQUEMA 2



En síntesis, considerando que los espectros de absorción de las β -carbolinas no muestran cambio alguno pese al agregado de pequeñas porciones de halometano a la solución, que los espectros de fluorescencia obtenidos en esas condiciones tienen la misma distribución espectral que aquéllos obtenidos sin el agregado de quencher, es decir tampoco se observaron nuevas bandas de fluorescencia siendo los gráficos de Stern Volmer resultantes rectas, resulta el mecanismo de desactivación del estado excitado singulete de las β -carbolinas por interacción con el halometano un proceso de tipo difusional, acompañado por la formación de un exciplete y/o transferencia de un electrón.

Como puede verse en la Tabla 27, los valores de k_q siguen una tendencia creciente al aumentar la polaridad del solvente. Esto está de acuerdo con el hecho de que los solventes más polares son más aptos para estabilizar excipletes con cierto grado de transferencia de carga.

Una excepción se produce en el caso de usar CCl_4 como quencher en acetonitrilo ya que los valores de k_q son mayores de lo esperado. Esto podría deberse a que al ser marcadamente menor la capacidad donora de protón del acetonitrilo, las moléculas de CCl_4

se aproximan a las moléculas del fluoróforo con mayor facilidad, no debiendo competir con uniones del tipo puente de hidrógeno pre existentes, las que se forman entre las moléculas del alcaloide y de los alcoholes. De esta manera se compensa en estos casos la estabilización producida por la solvatación del complejo formado en el solvente más polar.

Los valores de K_{sv} al usar $CHBr_3$ en acetonitrilo son mayores de lo esperado. Esto podría deberse a que también en este caso el fluoróforo puede acercarse con mayor facilidad a la β -carbolina no debiendo competir con uniones del tipo puente de hidrógeno preformadas entre el alcaloide y el solvente. También hay que tener en cuenta que estos valores pueden verse incrementados debido a una contribución en la disminución de la intensidad fluorescente de un equilibrio de tipo ácido-base. Como ya indicamos, el quencher en las soluciones orgánicas utilizadas (ciclohexano, acetonitrilo, 2-propanol) se descompone parcialmente para dar productos de carácter ácido.

Los valores de CBr_4 son mucho mayores de lo esperado, incluso en algunos casos mayores que el valor difusional, probablemente por las mismas razones que en el caso del $CHBr_3$. Si bien en el caso del $CHBr_3$ se lograron resultados sin una producción notable de ácido usando soluciones preparadas en el instante previo a la medición, en el caso del CBr_4 se repitieron varias veces estas experiencias sin obtener resultados confiables y reproducibles.

Como se observa en la Tabla 27 los valores de k_q obtenidos son ligeramente más elevados, en la mayoría de los quenchers usados, en el caso de la harmina que en el del *nor*-harmano y del harmano. Si bien las diferencias no son muy significativas, esto podría explicarse teniendo en cuenta que aquel alcaloide presenta dos grupos sustituyentes del tipo donores de electrones en los anillos aromáticos los que incrementan la densidad electrónica de la molécula, haciendo más favorable la transferencia de un electrón.

Para analizar los procesos de quenching de fluorescencia entre pares de especies con capacidad donora y aceptora de electrones han sido propuestos varios modelos en los que se

relaciona la constante de velocidad de quenching con propiedades termodinámicas relacionadas a su vez con su capacidad donora y aceptora de electrones.

Uno de estos modelos fue el propuesto por Plazanet⁸⁶. El mismo está basado en considerar la formación de un complejo de transferencia de carga en el estado excitado entre el donador y el aceptor (exciplete) como equivalente a la formación de un complejo activado del tipo definido por Eyring. El modelo se representa entonces con la siguiente ecuación:

$$\ln k_q = a + (PI_D - AE_A - C - P - ES_1)/kT \quad [27]$$

donde k_q es la constante de velocidad del proceso de quenching, PI_D es el potencial de ionización del donador, AE_A es la afinidad electrónica del aceptor, $-(C + P)$ es el término que tiene en cuenta la energía culómbica y de polarización, respectivamente, y ES_1 es la energía de excitación del estado electrónico excitado S_1 .

Este modelo ha sido aplicado a diferentes familias de compuestos. Así, en el caso de compuestos de la familia de los metilbencenos y halometanos se postuló que el quenching de la emisión fluorescente de los primeros también procedería vía la formación de un exciplete⁸⁷. Para una serie de metilbencenos frente a $CHCl_3$, al graficar el $\ln k_q$ en función de la diferencia de energía $PI_D - ES_1$ se obtuvo una recta según lo predicho por el modelo de Plazanet pero no con la pendiente esperada. Esta diferencia podría explicarse en opinión de los autores i) por la naturaleza de la descripción cuantitativa del proceso de quenching, *i.e.*, el uso de una teoría clásica para las constantes de velocidad en lugar de una descripción mecánico cuántica del sistema ii) o que el paso limitante del quenching no sólo sea la formación del exciplete sino que también exista algún otro tipo de equilibrio como la formación de un complejo no fluorescente en el estado fundamental.

Este modelo también se usó en el caso de hidrocarburos aromáticos policíclicos⁸⁸ donde también se postuló un quenching por los halometanos *via* la formación de un exciplete, aunque en este caso no haya una buena correlación con los valores de $PI_D - ES_1$. Los autores propusieron que esto podría deberse a que la transferencia de carga en el exciplete no sea total y los valores de $\ln k_q$ sí correlacionan con $0,7 PI_D - ES_1$.

3.3 Cálculos de la variación de energía libre de Gibbs asociada a la transferencia electrónica.

La factibilidad termodinámica de un proceso de transferencia electrónica puede ser evaluada en forma teórica haciendo uso de la ecuación de Rehm Weller⁸⁹

$$\Delta G^0_{te} = E^0_{ox}(D) - E^0_{red}(A) + \Delta E_{coul} \quad [28]$$

donde $E^0_{ox}(D)$ es el potencial de oxidación de la especie donora del electrón, $E^0_{red}(A)$ es el potencial de reducción de la especie aceptora del electrón y ΔE_{coul} es la energía de interacción culómbica entre dos iones radicales separados por una distancia a entre sí en un dado solvente.

$$\text{Este término se puede calcular según: } \Delta E_{coul} = e^2 / D a \quad [29]$$

donde e es la carga del electrón, D la constante dieléctrica del solvente y a es la distancia de separación del par ion radical formado luego de la transferencia del electrón. Los valores obtenidos para los solventes utilizados, etanol, 2-propanol y acetonitrilo (0,09, 0,11, 0,06 eV respectivamente) son menores al error experimental de las otras variables con lo cual se puede simplificar la ecuación [28] a

$$\Delta G^0_{te} = E^0_{ox}(D) - E^0_{red}(A) \quad [30]$$

Con el objeto de evaluar la factibilidad termodinámica del proceso de transferencia electrónica entre la β -carbolina en el estado electrónico excitado y los compuestos halogenados (paso [4] del esquema 2) a la ecuación [28] debe agregársele el término que tiene en cuenta la energía de excitación

$$\Delta G^0_{te} = E^0_{ox}(D) - E^0_{red}(A) - \Delta E_{0,0} + \Delta E_{coul} \quad [31]$$

donde los términos tienen el mismo significado que en la ecuación [28] y $\Delta E_{0,0}$ es la energía de la transición 0,0 de la especie excitada.

Por las consideraciones antes explicadas en este caso también se puede despreciar el término correspondiente a ΔE_{coul} , quedando entonces la ecuación simplificada de la forma

$$\Delta G_{\text{te}}^0 = E_{\text{ox}}^0(\text{D}) - E_{\text{red}}^0(\text{A}) - \Delta E_{\text{o,o}} \quad [32]$$

En esta expresión queda implícitamente asumido que la geometría del estado fundamental no difiere sustancialmente de la del estado excitado y que los cambios de entropía que acompañan al proceso son despreciables⁹⁰.

Los valores de $\Delta E_{\text{o,o}}$ fueron obtenidos como el promedio entre la energía correspondiente al λ máximo de absorción de menor energía y la correspondiente al λ máximo de emisión de mayor energía. Los valores así obtenidos se muestran en la Tabla 28.

Tabla 28 Valores de $\Delta E_{\text{o,o(a)}}$ de β -carbolinas aromáticas en etanol, 2-propanol y acetonitrilo

β -Carbolina	EtOH	i-PrOH	MeCN
<i>nor</i> -Harmano	3,45	3,48	3,55
Harmano	3,49	3,50	3,56
Harmina	3,59	3,59	3,64

(a) en eV

En la Tabla 29 se presentan los valores de ΔG_{te}^0 calculados para el posible proceso de transferencia electrónica entre las β -carbolinas en los estados electrónicos fundamental y excitado y los distintos halometanos en el estado fundamental.

Tabla 29 Valores de ΔG_{te}^0 (a) para β -carbolinas aromáticas(b)

β -Carbolina	Quencher	E_{red}^0 (V)(c)	ΔG_{te}^0 (d)	ΔG_{te}^0 (e)		
				EtOH	i-PrOH	MeCN
nor-Harmano	CH ₂ Cl ₂	-2,33	86,9	7,4	6,7	5,1
	CHCl ₃	-1,67	71,7	-7,8	-8,5	-10,1
	CH ₂ BrCH ₂ Br	-1,52	68,3	-11,3	-12,0	-13,6
	CH ₂ Br ₂	-1,48	67,3	-12,2	-12,9	-14,5
	CCl ₄	-0,78	51,2	-28,4	-29,1	-30,7
	CHBr ₃	-0,64	48,0	-31,6	-32,3	-33,9
	CBr ₄	-0,30	40,1	-39,4	-40,1	-41,7
Harmano	CH ₂ Cl ₂	-2,33	82,6	2,1	1,8	0,7
	CHCl ₃	-1,67	67,3	-13,1	-13,4	-14,5
	CH ₂ BrCH ₂ Br	-1,52	63,9	-16,6	-16,8	-18,0
	CH ₂ Br ₂	-1,48	63,0	-17,5	-17,8	-18,9
	CCl ₄	-0,78	46,8	-33,7	-33,9	-35,1
	CHBr ₃	-0,64	43,6	-36,9	-37,1	-38,3
	CBr ₄	-0,30	35,7	-44,7	-45,0	-46,1
Harmina	CH ₂ Cl ₂	-2,33	79,6	-3,2	-3,2	-4,4
	CHCl ₃	-1,67	64,3	-18,4	-18,4	-19,6
	CH ₂ BrCH ₂ Br	-1,52	60,9	-21,9	-21,9	-23,1
	CH ₂ Br ₂	-1,48	60,0	-22,8	-22,8	-24,0
	CCl ₄	-0,78	43,8	-39,0	-39,0	-40,1
	CHBr ₃	-0,64	40,6	-42,2	-42,2	-43,4
	CBr ₄	-0,30	32,7	-50,0	-50,0	-51,2

(a) en kcal mol⁻¹ error: $\pm 0,5$ kcal, (b) $E_{ox}^0(D)$ medidos en MeCN (V vs ECS): nor-harmano: 1,44; harmano: 1,25; harmina: 1,12 según lo detallado en la Parte Experimental E.6; (c) de ref. 91; (d) β -carbolinas en el estado electrónico fundamental; (e) β -carbolinas en el estado electrónico excitado singlete.

De los valores de ΔG^0_{te} obtenidos (Tabla 29) se concluye que la transferencia electrónica fotoinducida es un proceso termodinámicamente posible no así la transferencia de electrones en el estado fundamental.

En un trabajo reciente, Kikuchi⁹² hizo una reinterpretación del modelo de Rehm Weller. Según ésta el mecanismo de quencheo por transferencia de electrones está relacionado no sólo con la polaridad del solvente sino también con el valor de ΔG^0_{te} y la distancia de quenching efectiva r_{DA} . De acuerdo a esto el autor define cuatro regiones:

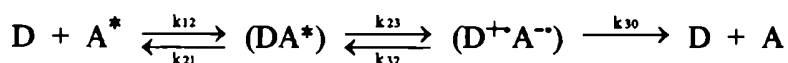
- i) $\Delta G^0_{te} > 9,22 \text{ kcal mol}^{-1}$. Como la transferencia electrónica es tan desfavorable energéticamente hablando, la interacción del tipo "transferencia de carga" es tan débil que aun en contacto molecular el quencher no quenchea al fluoróforo al menos por una transferencia efectiva de electrones. Sin embargo cuando el quencher contiene átomos pesados en su estructura puede ocurrir el quenching por un aumento del cruce intersistemas inducido por el efecto de átomo pesado externo.
- ii) $9,22 \text{ kcal mol}^{-1} > \Delta G^0_{te} > -9,22 \text{ kcal mol}^{-1}$. En este caso el quenching ocurriría a través de la formación previa de un exciplete ya que la diferencia de energía del estado electrónico excitado del exciplete y el estado del par radical iónico es pequeña estando permitido desde el punto de vista energético el mezclado de estos estados. En este caso entonces los procesos de desactivación no radiativos del exciplete, la conversión interna y el cruce intersistemas, son importantes, viéndose así reducida la posibilidad de la formación del par radical iónico por transferencia del electrón. Si la formación del exciplete es exotérmica, k_q se acerca al límite difusional, en cambio si la formación es endotérmica, k_q puede disminuir casi exponencialmente con el aumento de ΔG^0_{te} . La distancia r_{DA} es aproximadamente de 0,3 nm.
- iii) $-9,22 \text{ kcal mol}^{-1} > \Delta G^0_{te} > -46,12 \text{ kcal mol}^{-1}$. En este caso el quenching se debería casi exclusivamente a un mecanismo de transferencia del electrón tipo esfera externa con lo cual el valor de k_q se acerca al valor límite difusional y $r_{DA} \geq 0,7 \text{ nm}$.

iv) $\Delta G^{\circ}_{te} < -46,12 \text{ kcal mol}^{-1}$. La transferencia del electrón tipo esfera externa necesaria para producir el par ion radical puede no ser lo suficientemente rápida como para observar una k_q del orden difusional. Sin embargo, pueden darse tres formas alternativas de quenching a) transferencia del electrón de tipo esfera externa para producir un par ion radical electrónicamente excitado, $r_{DA} \geq 0,7 \text{ nm}$; b) formación de un exciplete como producto primario del quenching formado por la mezcla del estado electrónico del exciplete y del estado electrónico excitado del par ion radical, si la diferencia de energía entre estos dos estados es $< 0,4 \text{ eV}$ y $r_{DA} \sim 0,3 \text{ nm}$; c) formación de un complejo de contacto entre el fluoróforo y el quencher en el estado de encuentro seguida de una rápida desactivación al estado CT de menor energía, $r_{DA} \sim 0,3 \text{ nm}$. Como estos tres procesos pueden ocurrir rápidamente y competitivamente, el valor de k_q está en estos casos cercano al valor límite difusional.

Como puede verse en la Tabla 29 casi todos los casos estudiados en el presente trabajo quedan incluidos en la región iii): es decir la transferencia electrónica se debería probablemente a la formación de un exciplete entre la β -carbolina excitada y el quencher, seguida de una eficiente formación de los iones radicales, proceso éste que compite efectivamente con los otros procesos de desactivación del exciplete no radiativos.

El modelo de Rehm Weller se basa en el siguiente esquema cinético⁹³.

ESQUEMA 3



donde k_{12} y k_{21} son las constantes de velocidad de formación y disociación del complejo de encuentro (DA^*), k_{23} y k_{32} son las constantes de velocidad de donación y recuperación del electrón en el proceso de transferencia electrónica de D a A en el estado excitado y k_{30} es la constante de velocidad de la transferencia electrónica reversa al estado fundamental original. La constante de velocidad total (k_q) está dada por:

$$k_q = k_{12} k_{23} / [k_{23} + k_{21}(1 + k_{32}/k_{30})] \quad [33]$$

donde k_q es la constante de velocidad obtenida a partir de la ecuación de Stern-Volmer

si $k_{30} \gg k_{32}$, entonces queda: $k_q = k_{12} k_{23} / (k_{23} + k_{21})$

definiendo $k_{te} = k_{23} k_{12} / k_{21}$, queda que $k_{te}^{-1} = k_q^{-1} - k_{12}^{-1}$ [34]

donde $k_{12} = k_{dir}$

Sabiendo que $\Delta G^\ddagger = -RT \ln (k_{te}/Z)$ [35]

reemplazando [34] en [35] queda:

$$\Delta G^\ddagger = 2,3 R T \log [Z (k_q^{-1} - k_{dir}^{-1})] \quad [36]$$

donde ΔG^\ddagger es la energía libre de Gibbs de activación del proceso de transferencia electrónica bimolecular y Z es la frecuencia colisional = $1 \times 10^{11} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

Como hemos visto se pueden calcular tanto los valores de ΔG_{te}^0 como los de ΔG^\ddagger del proceso de transferencia electrónica. Estos dos parámetros se relacionan a través de relaciones de energía libre. Entre las distintas propuestas se destacan

a) la ecuación cuadrática de Marcus⁹⁴

$$\Delta G^\ddagger = \Delta G^\ddagger(0) [1 + (\Delta G_{te}^0 / 4 \Delta G^\ddagger(0))]^2 \quad [37]$$

b) la ecuación empírica de Rehm Weller⁸⁹ luego deducida por Lewis y More O'Ferrall⁹⁵

$$\Delta G^\ddagger = (\Delta G_{te}^0 / 2) + [(\Delta G_{te}^0 / 2)^2 + \Delta G^\ddagger(0)^2]^{1/2} \quad [38]$$

c) la ecuación hiperbólica deducida primero por Marcus⁹⁶ para reacciones de transferencia de átomos y luego formulada empíricamente por Agmon y Levine⁹⁷ basada en la teoría BEBO ("bond energy-bond order")

$$\Delta G^\ddagger = \Delta G_{te}^0 + (\Delta G^\ddagger(0) / \ln 2) \ln [1 + \exp(-\Delta G_{te}^0 \ln 2 / \Delta G^\ddagger(0))] \quad [39]$$

donde la barrera intrínseca de la reacción $\Delta G^\ddagger(0)$ es la ΔG^\ddagger de la reacción isoenergética, es decir cuando $\Delta G_{te}^0 = 0$.

Las ecuaciones [38] y [39] exhiben un comportamiento similar en todo el rango de ΔG_{te}^0 estudiado⁹⁸. En ambas ecuaciones ΔG^\ddagger tiende asintóticamente hacia cero en las regiones altamente exergónicas y hacia ΔG_{te}^0 en las regiones altamente endergónicas, comportamiento que parece intuitivamente razonable, mientras que la ecuación [37] se ve limitada a valores de ΔG_{te}^0 comprendidos en el rango de $\pm 4\Delta G^\ddagger(0)$ ⁹⁹.

Si comparamos las expresiones de la variable de progreso $\alpha = d \Delta G^\ddagger / d \Delta G_{te}^0$, la cual describe la posición del estado de transición a lo largo de la coordenada de reacción:

$$\alpha = 1 / (2 - \Delta G_{te}^0 / \Delta G^\ddagger) \quad \text{de la ecuación [38] con}$$

$$\alpha = 1 / [1 + \exp(-\Delta G_{te}^0 \ln 2 / \Delta G^\ddagger(0))] \quad \text{de la ecuación [39]}$$

se observa que la primera expresión es mucho más simple, ya que en el caso de la segunda ecuación se requiere la evaluación previa de $\Delta G^\ddagger(0)$.

Por lo tanto decidimos usar la expresión [38] para calcular $\Delta G^\ddagger(0)$, si bien la hipérbola de la ecuación es arbitraria, combina la simplicidad analítica con la auto consistencia derivada del usar límites correctos^{95,99}.

Entonces si ahora combinamos las ecuaciones [32] y [38] tenemos que

$$\Delta G^\ddagger/F + E_{red}^0(A) = E_{ox}^0(D) - \Delta E_{o,o} + (\Delta G^\ddagger(0)^2/F) 1/\Delta G^\ddagger \quad [40]$$

Al graficar los valores de ΔG^\ddagger obtenidos a partir de los datos de k_q con los valores de $E_{\text{red}}^0(\text{A})$ obtenidos de la literatura⁹¹ en función de $1/\Delta G^\ddagger$, haciendo una regresión lineal por el método de cuadrados mínimos se obtienen, a partir de los valores de pendiente y ordenada al origen, los valores de $(E_{\text{ox}}^0(\text{D}) - \Delta E_{\text{o},\text{o}})$ y $\Delta G^\ddagger(0)$. A partir de estos valores se pueden calcular los $E_{\text{ox}}^0(\text{D})$. Estos valores se presentan en la Tabla 30.

Tabla 30 Valores de $E_{\text{ox}}^0(\text{D})$ (a) y $\Delta G^\ddagger(0)$ (b) obtenidos a partir de la ecuación [40]

Solvente	<i>nor</i> -Harmano		Harmano		Harmina	
	$E_{\text{ox}}^0(\text{D})$	$\Delta G^\ddagger(0)$	$E_{\text{ox}}^0(\text{D})$	$\Delta G^\ddagger(0)$	$E_{\text{ox}}^0(\text{D})$	$\Delta G^\ddagger(0)$
EtOH	1,15	6,80	0,73	9,03	0,62	8,81
i-PrOH	0,83	8,82	0,76	9,29	0,67	10,32
MeCN	1,16	8,30	1,12	8,85	0,76	11,16

(a) en volts; (b) en kcal mol⁻¹

La propuesta de la formación de un complejo entre la β -carbolina en el estado electrónico excitado y el halometano (exciplete), con un cierto carácter de transferencia de carga, estaría además avalada porque al relacionar los datos de k_q obtenidos con los valores de ΔG_{te}^0 calculados a partir del modelo de Rehm-Weller, como puede verse en las Figuras 30, 31 y 32, los datos experimentales caen dentro de la curva obtenida a partir de los valores de k_q calculados a partir de valores ΔG^\ddagger obtenidos al usar la ecuación [38] con valores de ΔG_{te}^0 arbitrarios y los valores de $\Delta G^\ddagger(0)$ obtenidos a partir de la ecuación [40] (modelo de Rehm Weller-Lewis More O'Ferrall^{89,95}). Puede verse que a partir de un cierto valor de ΔG_{te}^0 , los valores de k_q tienden a los del valor límite difusional. En las mismas Figuras se observa la curva obtenida al graficar los valores de $\log k_q$ obtenidos al usar la ecuación [37]

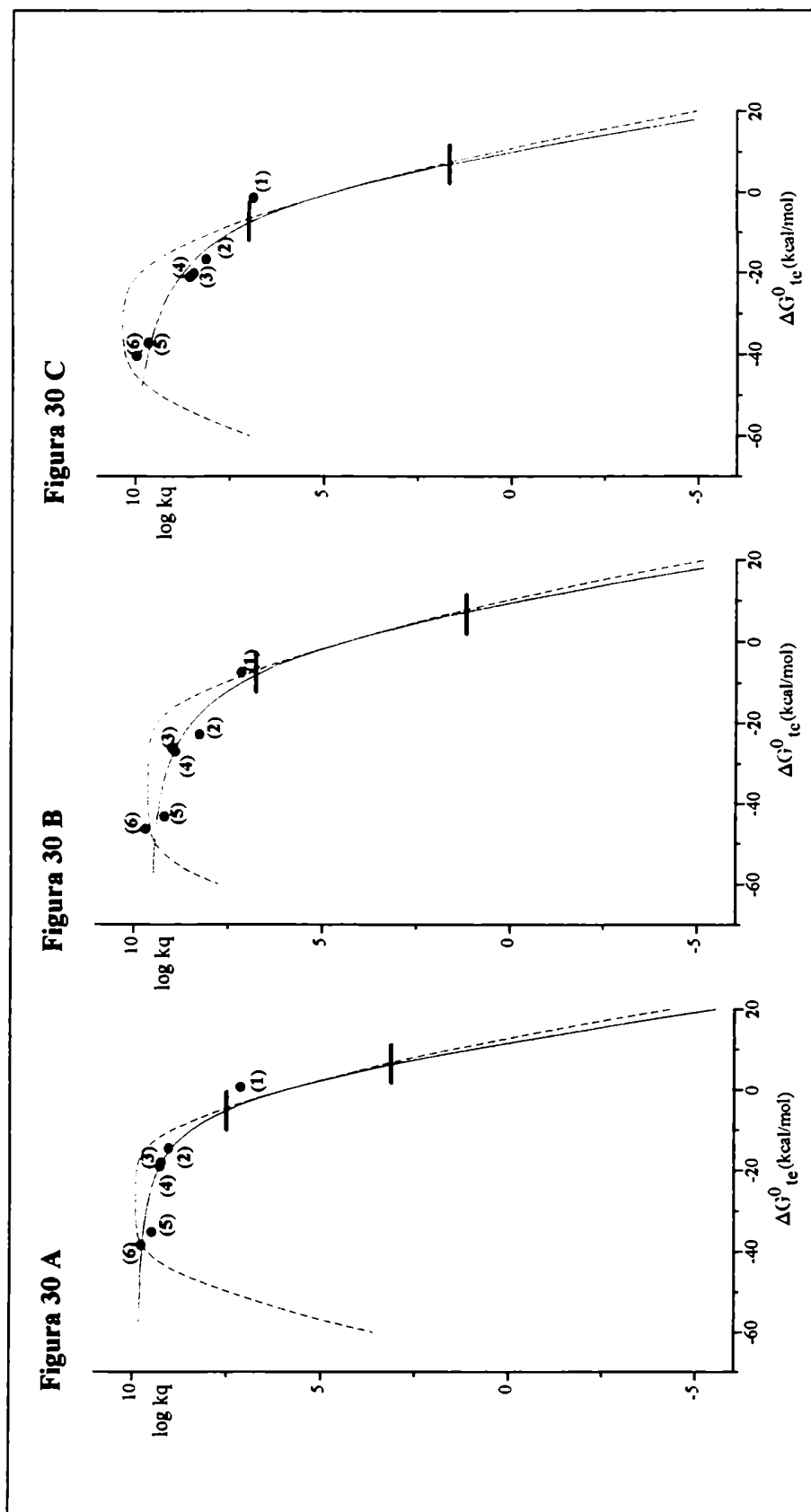


Figura 30 Log k_q en función de ΔG^{\ddagger}_{te} para soluciones de *nor*-harmano en EtOH: 30A, en *i*-PrOH: 30B, en MeCN 30C, (●) valores experimentales (1) CH_2Cl_2 , (2) CHCl_3 , (3) $\text{CH}_2\text{BrCH}_2\text{Br}$, (4) CH_2Br_2 , (5) CCl_4 , (6) CHBr_3 ; (—) curva calculada a partir de las ecuaciones [36] y [38]; (-----) curva calculada a partir de la ecuaciones [36] y [37]; (—) indican la región de $-\Delta G^{\ddagger}(0) \text{ a } +\Delta G^{\ddagger}(0)$ alrededor de $\Delta G^{\ddagger}_{te} = 0$.

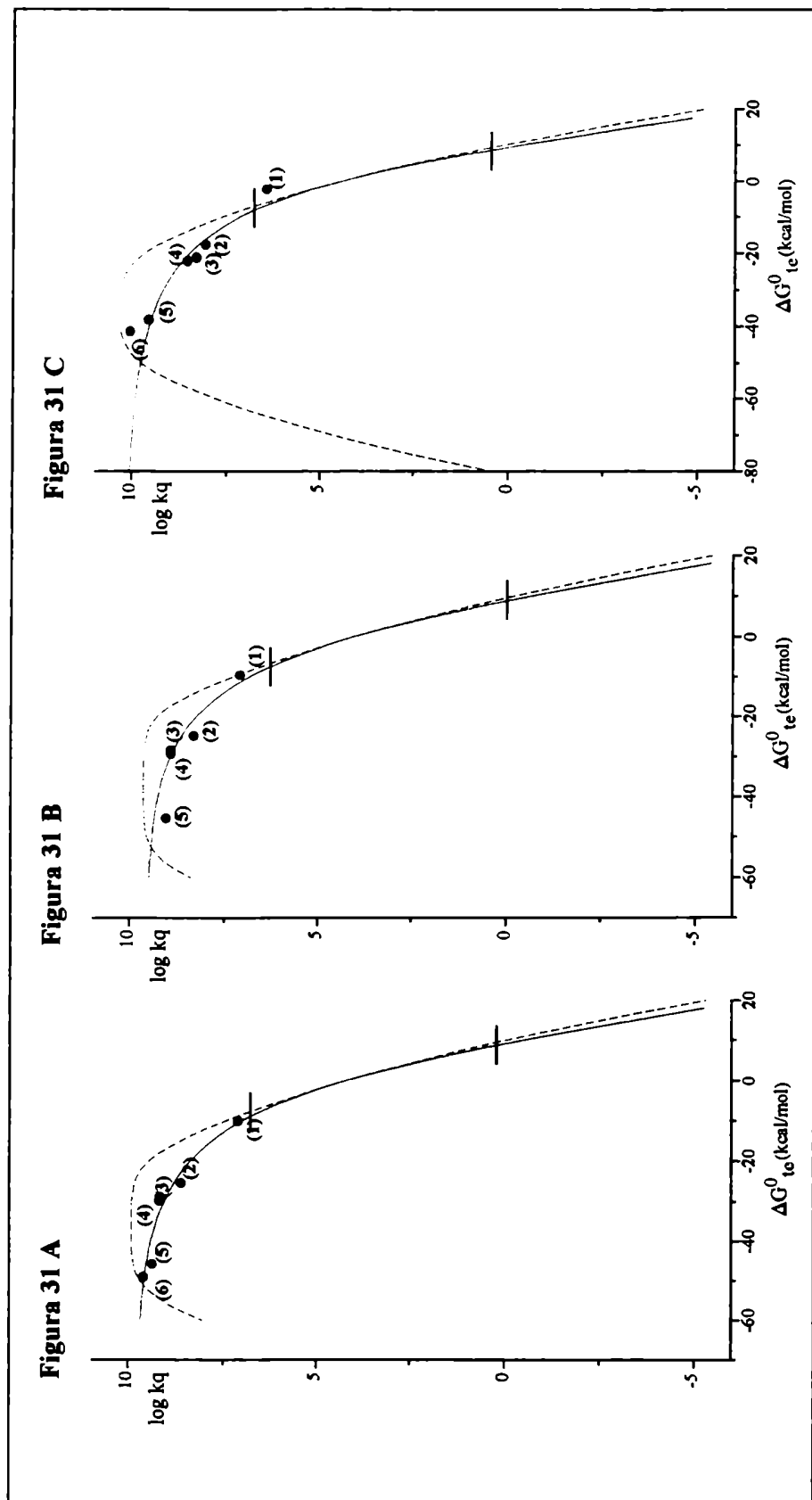


Figura 31 Log kq en función de ΔG°_{te} para soluciones de **harmano** en EtOH: **31A**, en i-PrOH: **31B**, en MeCN **31C**, (●) valores experimentales (1) CH_2Cl_2 , (2) CHCl_3 , (3) $\text{CH}_2\text{BrCH}_2\text{Br}$, (4) CH_2Br_2 , (5) CCl_4 , (6) CHBr_3 ; (—) curva calculada a partir de las ecuaciones [36] y [38]; (-----) curva calculada a partir de la ecuaciones [36] y [37]; (— · —) indican la región de $-\Delta G^{\ddagger}(0)$ a $+\Delta G^{\ddagger}(0)$ alrededor de $\Delta G^{\circ}_{te} = 0$.

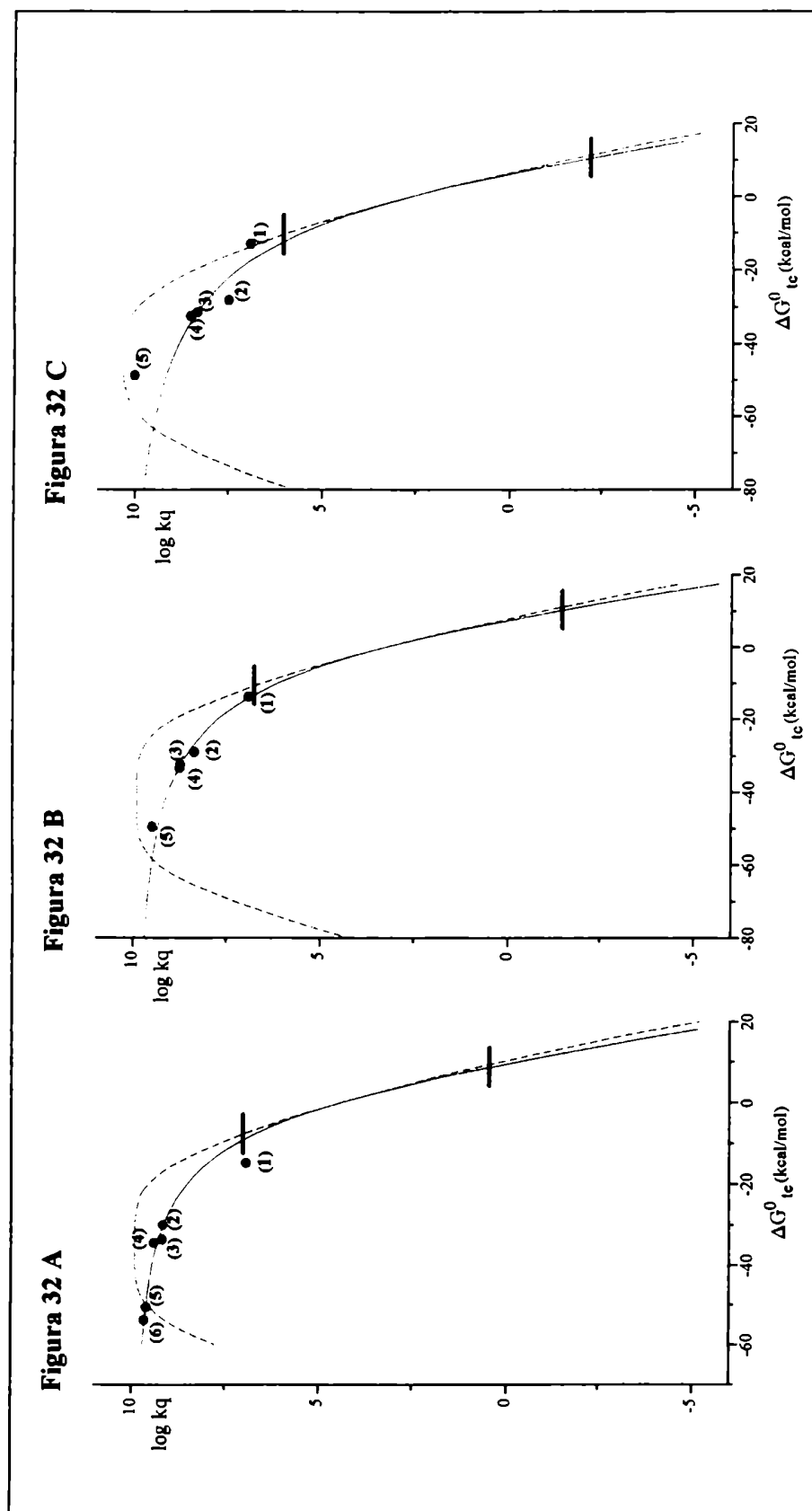


Figura 32 Log kq en función de ΔG°_{tc} para soluciones de **harmina** en EtOH: **32A**; en i-PrOH: **32B**, en MeCN **32C**, (●) valores experimentales (1) CH_2Cl_2 , (2) CHCl_3 , (3) $\text{CH}_2\text{BrCH}_2\text{Br}$, (4) CH_2Br_2 , (5) CCl_4 , (6) CHBr_3 ; (—) curva calculada a partir de las ecuaciones [36] y [38]; (----) curva calculada a partir de la ecuaciones [36] y [37]; (-·-·-) indican la región de $-\Delta G^{\ddagger}(0)$ a $+\Delta G^{\ddagger}(0)$ alrededor de $\Delta G^{\circ}_{tc} = 0$.

(ecuación cuadrática de Marcus) con valores de ΔG^0_{te} arbitrarios y los valores de $\Delta G^\ddagger(0)$ obtenidos a partir de la ecuación [40]. La ecuación [37] predice que los valores de k_q deberían disminuir al llegar a valores de $\Delta G^0_{te} < -4\Delta G^\ddagger(0)$. Este comportamiento no se observa experimentalmente. En general en estos sistemas, donde la transferencia de electrón ocurre en forma irreversible luego del encuentro del donador y del aceptor, no se encontraron ejemplos de la región invertida de Marcus. La falta de ejemplos en esta zona se explica en general proponiendo que el paso limitante del proceso de quenching en regiones altamente exergónicas, es decir con $\Delta G^0_{te} < -4 \Delta G^\ddagger(0)$ es distinto que en las regiones de $\Delta G^0_{te} > -4 \Delta G^\ddagger(0)$. Cabe señalar que existen pocos ejemplos de transferencia electrónica bimolecular en la región invertida de Marcus. De hecho estos ejemplos son de reacciones bimoleculares de transferencia electrónica inversa ("back electron transfer")¹⁰⁰.

Cuando graficamos ΔG^\ddagger en función de ΔG^0_{te} (Figuras 33, 34, 35) según la teoría de Marcus deberíamos obtener parábolas. En el caso de un proceso de transferencia de electrón entre dos especies diferentes no enlazadas, éste puede ser formulado como la reacción cruzada de dos reacciones de auto-intercambio¹⁰¹. Siguiendo este razonamiento el modelo predice que en un intervalo pequeño alrededor de $\Delta G^0_{te} = 0$, generalmente $|\Delta G^0_{te}| < \Delta G^\ddagger(0)$, $\Delta G^\ddagger = 0,5 \Delta G^0_{te}$. En las Figuras 33 a 35 se señala esta región y se pueden ver las rectas esperadas. Una consecuencia de esto es que el gráfico de $\log k_q$ vs ΔG^0_{te} en la región $|\Delta G^0_{te}| < \Delta G^\ddagger(0)$ debería ser una recta de pendiente $-0,5 / 2,303 RT$. De hecho si se elige un rango suficientemente pequeño de $\log k_q$ (o ΔG^\ddagger) siempre se puede obtener una recta. Esto explicaría por qué se encontraron tantos ejemplos que coincidían con lo postulado por el modelo de Laustriat y Plazanet⁸⁶.

Es importante destacar que al trabajar con moléculas orgánicas la medición de los potenciales de oxidación y de reducción suele ser bastante difícil cuando la reacción no es reversible. Además en general el número de solventes que cumplen con las condiciones

necesarias para efectuar las mediciones es limitado. Por lo tanto una de las ventajas del uso del modelo de Rehm-Weller-Lewis-More O'Ferrall^{89,95} es el de poder no sólo modelar la reacción estudiada, sino además calcular los $E_{\text{ox}}^0(\text{D})$ o $E_{\text{red}}^0(\text{A})$. Como se ve en la Tabla 30, los datos de $E_{\text{ox}}^0(\text{D})$ obtenidos en este trabajo aplicando este modelo son del orden de los obtenidos experimentalmente por voltametría cíclica (Tabla 29). Si bien no son muy exactos resultan de gran utilidad cuando no es posible su determinación experimental.

Los valores de $\Delta G^\ddagger(0)$ resultaron similares para los distintos solventes utilizados. A su vez se nota una ligera tendencia creciente en el orden *nor*-harmano, harmano, harmina, tendencia normal si se tiene en cuenta el efecto de los sustituyentes presentes en las moléculas. De todas formas las diferencias son pequeñas con lo cual es posible considerar a los donores estudiados dentro de un mismo grupo.

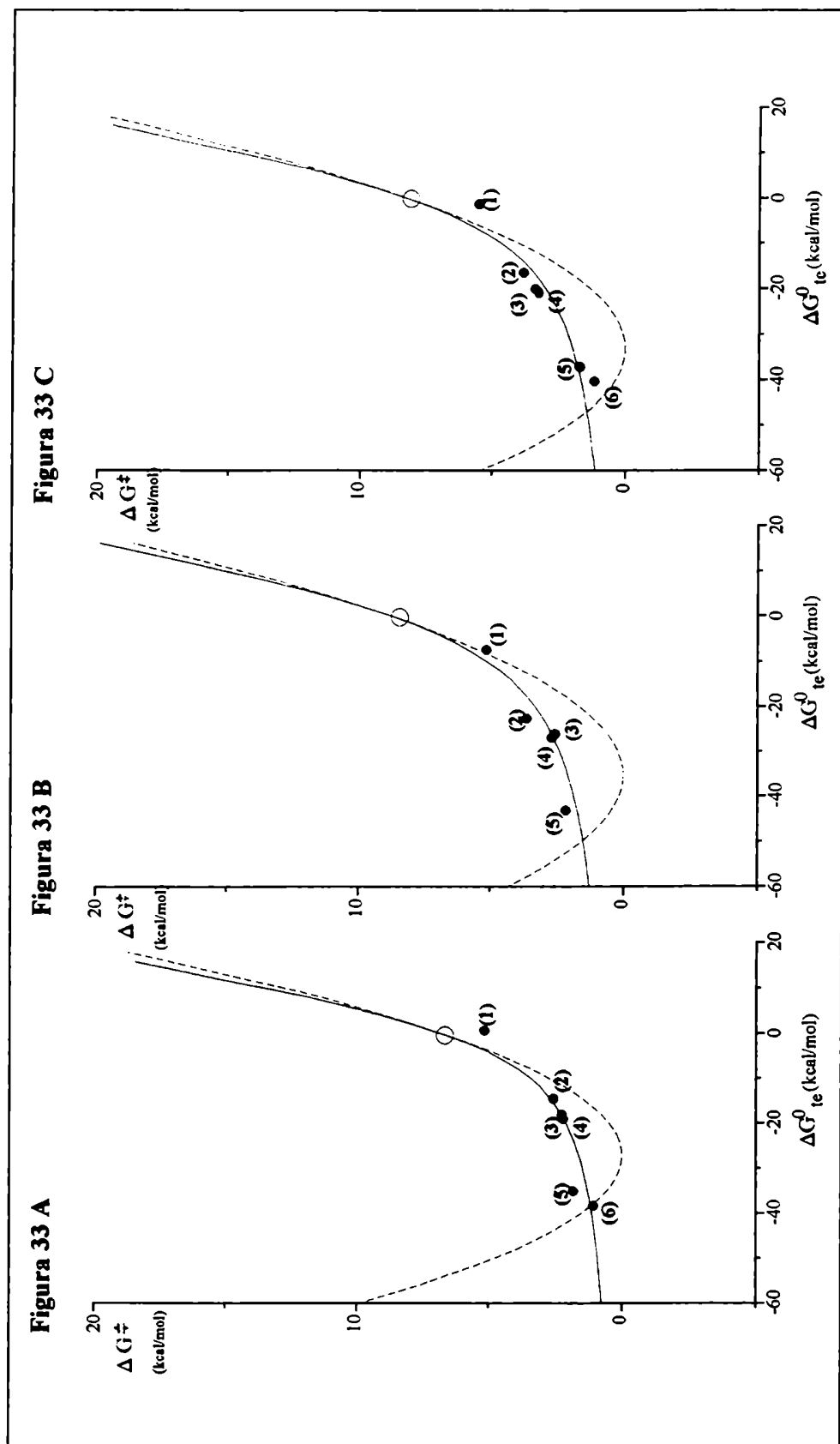


Figura 33 ΔG^\ddagger en función de ΔG_{te}^0 para soluciones de *nor*-harmeno en EtOH: 33A; en *i*-PrOH: 33B; en MeCN: 33C; (●) valores experimentales (1) CH_2Cl_2 , (2) CHCl_3 , (3) $\text{CH}_2\text{BrCH}_2\text{Br}$, (4) CH_2Br_2 , (5) CCl_4 , (6) CHBr_3 ; (—) curva calculada a partir de la ecuación [38]; (-----) curva calculada a partir de la ecuación [37]; (○) valor de $\Delta G^\ddagger(0)$.

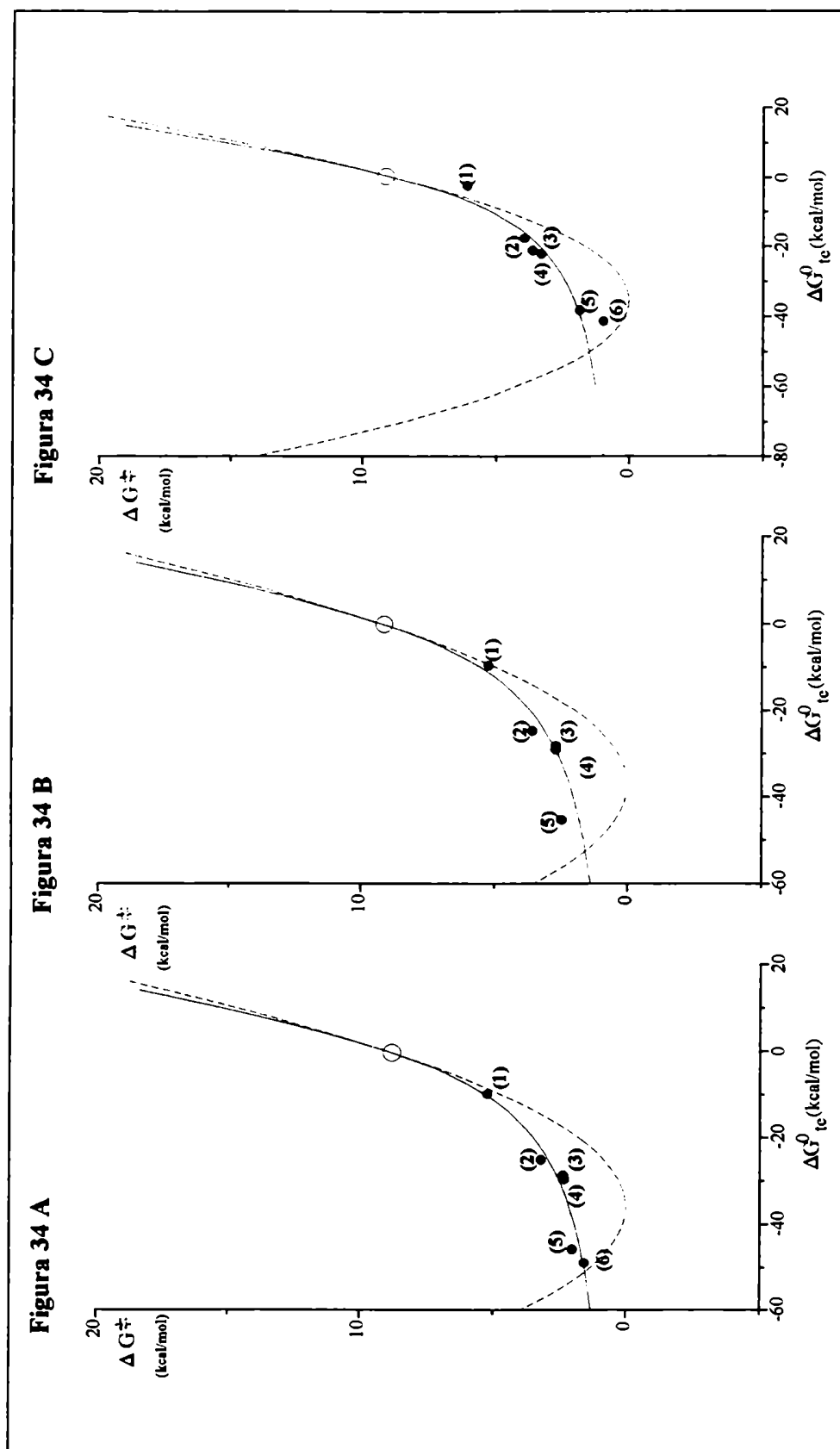


Figura 34 ΔG^\ddagger en función de ΔG°_{tc} para soluciones de **harman** en EtOH: **34A**; en i-PrOH: **34B**; en MeCN: **34C**; (●) valores experimentales (1) CH_2Cl_2 , (2) CHCl_3 , (3) $\text{CH}_2\text{BrCH}_2\text{Br}$, (4) CH_2Br_2 , (5) CCl_4 , (6) CHBr_3 ; (—) curva calculada a partir de la ecuación [38]; (-----) curva calculada a partir de la ecuación [37]; (○) valor de $\Delta G^\ddagger(0)$.

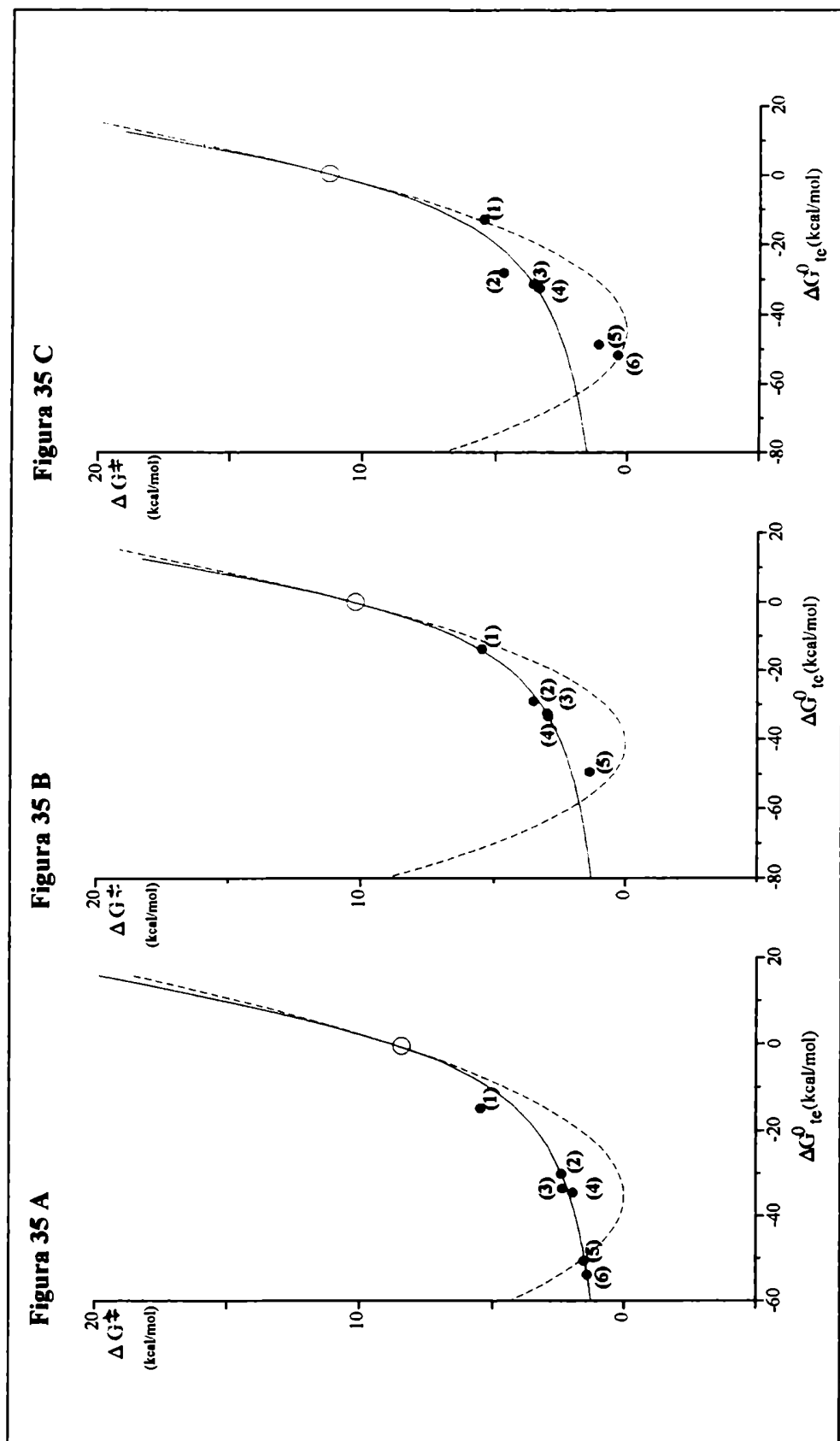


Figura 35 ΔG^\ddagger en función de ΔG°_{tc} para soluciones de **harmine** en EtOH: **35A**; en i-PrOH: **35B**; en MeCN: **35C**; (●) valores experimentales (1) CH_2Cl_2 , (2) CHCl_3 , (3) $\text{CH}_2\text{BrCH}_2\text{Br}$, (4) CH_2Br_2 , (5) CCl_4 , (6) CHBr_3 ; (—) curva calculada a partir de la ecuación [38]; (-----) curva calculada a partir de la ecuación [37]; (○) valor de $\Delta G^\ddagger(0)$.

3.4 Cálculos de la energía de reorganización del solvente λ

La barrera intrínseca de la reacción $\Delta G^\ddagger(0)$, según la teoría de Marcus, se relaciona con λ , la energía de reorganización del solvente en la transferencia de electrón según:

$$\Delta G^\ddagger(0) = \lambda / 4 \quad [41]$$

donde

$$\lambda = \lambda_i + \lambda_o \quad [42]$$

donde λ_i es la energía de la esfera de coordinación interna asociada a cambios estructurales y λ_o es la energía de la esfera de coordinación externa asociada a la reorganización del solvente. El valor de λ_i puede calcularse¹⁰² a partir de la diferencia del potencial de ionización vertical, I_v , y el potencial de ionización adiabático, I_a . El I_v se define como la diferencia de energía entre el estado fundamental y la parte de la curva de energía potencial del estado ionizado donde la transición tiene más probabilidades de ocurrir según el principio de Franck Condon y se puede calcular como la diferencia de la diferencia del calor de formación $\Delta(\Delta H_f)$ entre la molécula en su forma neutra con la geometría optimizada y el catión radical con la geometría optimizada de la forma neutra. El I_a , que se define como la diferencia de energía entre el estado vibracional de mínima energía del estado fundamental de la molécula neutra y el estado vibracional de mínima energía del ion, se puede calcular como la $\Delta(\Delta H_f)$ entre la molécula en su forma neutra con la geometría optimizada y el catión radical con la geometría optimizada como tal. Ambas $\Delta(\Delta H_f)$ pueden calcularse usando el método semiempírico PM3⁴⁵.

Entonces λ_o se calcula como $\lambda_o = 4 \Delta G^\ddagger(0) - \lambda_i$

A su vez λ_o también puede calcularse teóricamente a partir de la siguiente expresión⁹⁴:

$$\lambda_o = e^2 (1/n - 1/D) (1/2r_D + 1/2r_A - 1/(r_D+r_A)) \quad [43]$$

donde e es la carga del electrón, n el índice de refracción, D la constante dieléctrica, r_D y r_A son los radios de la molécula de donador y aceptor respectivamente.

En nuestro caso usamos los radios obtenidos a partir del volumen de la molécula, considerándola una esfera, el cual fue obtenido a partir del programa Hyper Chem-Chem Plus⁴⁵.

Los valores obtenidos se presentan en la Tabla 31.

Tabla 31 Valores de λ , λ_i y λ_o

β -Carbolina	solvente	$\Delta G^\ddagger(0)$ (kcal/mol)	$\lambda(a)$ (kcal/mol)	$\lambda_i(b)$ (kcal/mol)	$\lambda_o(c)$ (kcal/mol)	$\lambda_o(d)$ (kcal/mol)
<i>nor</i> -Harmano	EtOH	6,80	27,20	7,1	20,1	19,0
	i-PrOH	8,82	35,28	7,1	28,2	18,0
	MeCN	8,30	33,20	7,1	26,1	20,1
Harmano	EtOH	9,03	36,12	7,3	28,8	19,0
	i-PrOH	9,29	37,16	7,3	29,9	18,0
	MeCN	8,85	35,40	7,3	28,1	20,1
Harmina	EtOH	8,81	35,24	7,0	28,2	19,0
	i-PrOH	10,30	41,20	7,0	34,2	18,0
	MeCN	11,20	44,80	7,0	37,8	20,1

(a) $\lambda = 4 \Delta G^\ddagger(0)$; (b) λ_i obtenido partir de cálculos PM3; (c) $\lambda_o = \lambda - \lambda_i$; (d) λ_o obtenido a partir de la ecuación [43] con $r_D = 5 \text{ \AA}$ y $r_A = 4 \text{ \AA}$.

Como se ve en la Tabla 31 los valores de λ_o obtenidos por ambos métodos son del mismo orden. Cabe destacar que la λ_i no es completamente despreciable, aunque, según lo esperado, la mayor contribución a la energía de reorganización está dada por la energía de reorganización del solvente λ_o . Además, ésta no varía notablemente entre los solventes usados, lo que era de esperar ya que se trata de solventes polares (ver Tabla 17, Capítulo 1).

3.5 Apagamiento de fluorescencia con altas concentraciones de quencher

Adicionalmente se realizaron los estudios de apagamiento de la fluorescencia en presencia de altas concentraciones de CH_2Cl_2 , CHCl_3 y CCl_4 (1 a 10 M).

Si una molécula de β -carbolina es excitada cuando tiene una molécula de quencher inmediatamente adyacente, la molécula es entonces quencheada instantáneamente no siendo por lo tanto observable su fluorescencia. Se define entonces la esfera de quenching como una esfera de volumen v donde la probabilidad de quenching instantáneo es uno. Considerando que la distribución de las moléculas de quencher sigue una distribución de Poisson en la esfera de volumen v , la proporción de fluoróforos observables se reduce en un factor de $\exp(-v [Q] N/1000)$. La ecuación de Stern Volmer modificada que describe esta situación es entonces²⁸:

$$I_0/I = (1 + K_{sv} [Q]) \exp ([Q]v N/1000). \quad [44]$$

En el caso de usar como quencher al CCl_4 en distintos solventes tales como metanol, etanol, 2-metil-2-propanol, acetonitrilo, CH_2Cl_2 y CHCl_3 como puede verse en la Figura 36, se obtuvieron curvas que ajustan con este modelo. A partir de ellas se obtuvieron los valores de K_{sv} y r , radio de la esfera v , los que se presentan en la Tabla 32.

Tabla 32 Valores de Ksv y radios de la esfera de quenching para β -carbolinas aromáticas^(a) usando altas concentraciones de CCl₄ como quencher^(b).

Solvente ^(a)	<i>nor</i> -Harmano ^(c)		Harmano ^(d)		Harmina ^(e)	
	Ksv (M ⁻¹)	r (m x10 ¹⁰)	Ksv (M ⁻¹)	r (m x10 ¹⁰)	Ksv (M ⁻¹)	r (m x10 ¹⁰)
MeOH	3,6	3,2	12,8	1,8	23,9	2,4
EtOH	10,1	2,8	15,5	3,8	41,1	3,3
t-BuOH	5,8	2,6	7,0	3,9	19,1	3,7
MeCN	10,4	2,5	34,3	3,4	108,3	3,1
CH ₂ Cl ₂			5,5	3,4	9,1	6,3
CHCl ₃	1,76	4,3	3,4	2,9	5,9	3,8

(a) β -carbolina: concentración *ca.* 5×10^{-5} M; (b) CCl₄: concentración 1 a 10 M; (c) *nor*-harmano: λ_{exc} : 286 nm; λ_{em} : en MeOH: 379 nm, en EtOH: 379 nm, en t-BuOH: 377 nm, en MeCN: 370 nm, en CHCl₃: 366 nm; (d) harmano: λ_{exc} : 286 nm; , λ_{em} : en MeOH: 375 nm, en EtOH: 375 nm, en t-BuOH: 374 nm, en MeCN: 370 nm, en CH₂Cl₂: 366 nm, en CHCl₃: 366 nm; (e) harmina: λ_{exc} : 300 nm; , λ_{em} : en MeOH: 366 nm, en EtOH: 367 nm, en t-BuOH: 366 nm, en MeCN: 360 nm, en CH₂Cl₂: 358 nm, en CHCl₃: 358 nm.

Del análisis de los datos presentados en la Tabla 32 surge que los valores del r_{DA} oscilan entre 0,3 y 0,4 nm. Teniendo en cuenta los valores calculados de ΔG°_{te} (ver Tabla 29) y la interpretación de Kikuchi⁹² comentada anteriormente el r_{DA} debería ser 0,7 nm. Esto nos indujo a pensar o que el modelo elegido no era el correcto o había algún otro factor que influía en el apagamiento de la fluorescencia. Por lo tanto repetimos las experiencias controlando cuidadosamente los espectros de absorción. Encontramos que con CCl₄ Mallinkrodt (el utilizado para realizar las experiencias de fluorescencia) se observaron

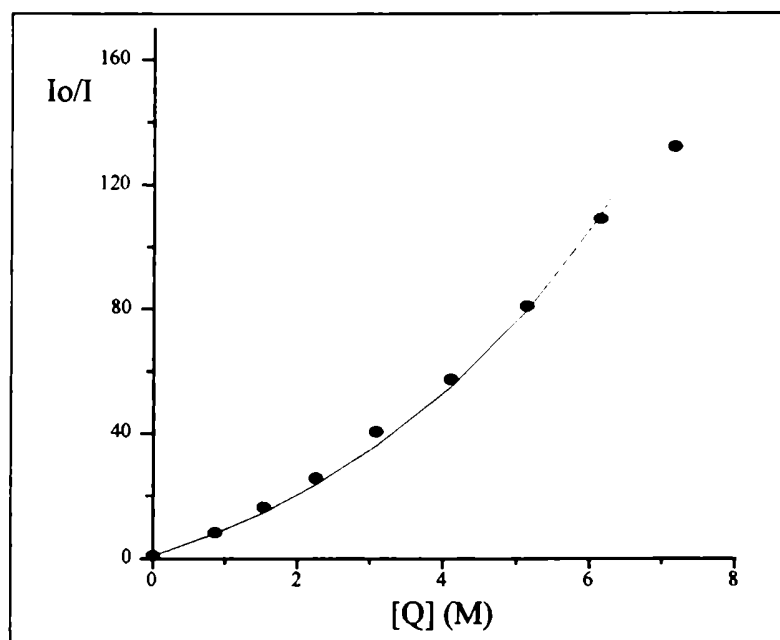


Figura 36 Gráfico de Stern-Volmer. **Harmano** en t-BuOH (c: $ca\ 3 \times 10^{-5}$ M), con Q = CCl_4 (●); λ_{exc} 336 nm, λ_{em} 371 nm, T 298 K. Curva obtenida a partir de una regresión no lineal por cuadrados mínimos.

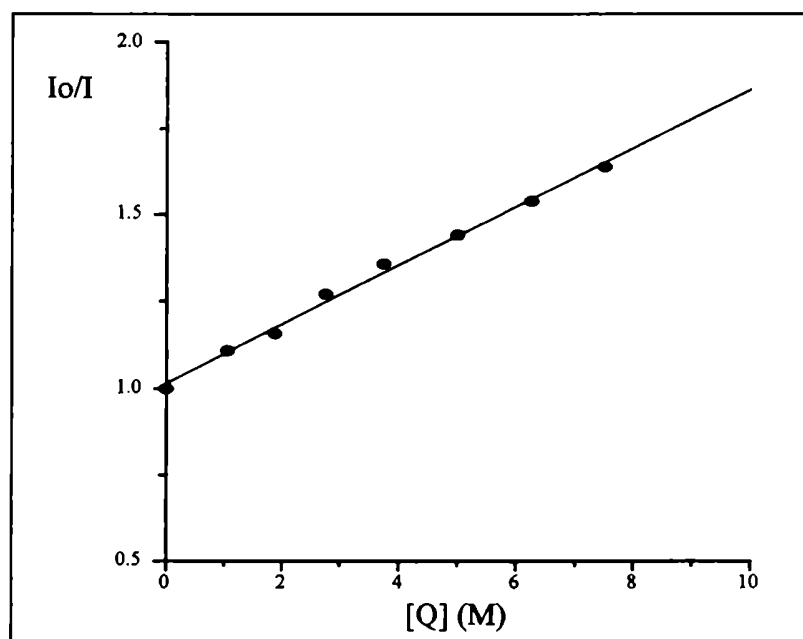


Figura 37 Gráfico de Stern-Volmer. **Harmano** en t-BuOH (c: $ca\ 3 \times 10^{-5}$ M), con Q = CHCl_3 (●); λ_{exc} 336 nm, λ_{em} 371 nm, T 298 K. Recta obtenida a partir de una regresión lineal por cuadrados mínimos.

cambios en el espectro de absorción similares a los descritos para el CHBr_3 y CBr_4 en cambio al usar CCl_4 Merck o Dorwill estos cambios no se produjeron y las rectas de Stern Volmer siguieron un comportamiento similar al observado para el CH_2Cl_2 y el CHCl_3 . (ver Tabla 33)

En los casos donde se usó CH_2Cl_2 y CHCl_3 como quenchers en solventes tales como etanol, 2-propanol y 2-metil-2-propanol se obtuvieron rectas que seguían la ecuación de Stern Volmer sin modificar, como se puede ver en la Tabla 33 y en el ejemplo que se muestra en la Figura 37.

Tabla 33 Valores de las Ksv de β -carbolinas aromáticas en diferentes medios usando altas concentraciones de CH_2Cl_2 , CHCl_3 y CCl_4 como quenchers(a)

Solvente	<i>nor</i> -Harmano(b)			Harmano(b)			Harmina(b)		
	CH_2Cl_2	CHCl_3	CCl_4	CH_2Cl_2	CHCl_3	CCl_4	CH_2Cl_2	CHCl_3	CCl_4
EtOH	0,059	0,072	7,3	0,065	0,080	6,0	0,038	0,083	14
i-PrOH	0,045	0,088	6,3	0,047	0,078		0,023	0,061	
t-BuOH	0,054	0,092	4,3	0,041	0,087	8,0	0,023	0,082	10,2

(a) Ksv en M^{-1} , quenchers: concentración 1 a 10 M; (b) condiciones experimentales indicadas en la Tabla 32, con λ_{em} en i-PrOH: *nor*-harmano: 377 nm, harmano: 375 nm y harmina: 367 nm.

La falta de curvatura en las curvas de Stern Volmer trabajando con altas concentraciones de halometanos (concentraciones de quencher hasta 10 M), indica que el proceso de quenching a través de la formación de un exciplete estaría limitado por barreras estéricas y/o entrópicas antes que barreras de energía térmica¹⁰³.

Los valores obtenidos usando como quencher CH_2Cl_2 son similares tanto con altas como con bajas concentraciones de CH_2Cl_2 . Esto indica que el CH_2Cl_2 actúa solamente como un quencher débil no modificando mayormente las propiedades del medio. Además como ya discutimos los bajos valores de ΔG_{te}^0 indican que es poco probable la transferencia de electrones entre la β -carbolina y éste, siendo por lo tanto lógico obtener valores bajos de K_{sv} .

En el caso del CHCl_3 y CCl_4 los valores no coinciden. Esto podría explicarse considerando que a bajas concentraciones de CHCl_3 y CCl_4 el solvente es casi todo ROH, cuyas moléculas están asociadas entre sí. Por lo tanto el halometano para actuar como quencher debe competir con el ROH libre (no asociado) el que se compleja con la β -carbolina. En el caso donde el ROH está más diluido por la gran concentración de halometano, en proporción habrá más moléculas de ROH libres que compitan con las moléculas CHCl_3 o CCl_4 para complejarse con las de la β -carbolina, haciendo de esta forma al quenching menos efectivo. Debe destacarse que en el caso del CCl_4 los valores obtenidos de K_{sv} son del mismo orden mientras que en el caso del CHCl_3 éstos varían entre 1 y 2 órdenes (ver Tablas 27 y 33). Esto puede explicarse al considerar que como el CCl_4 es mejor aceptor de electrones que el CHCl_3 el equilibrio de complejación con los alcoholes tiene menos importancia relativa.

Conclusiones

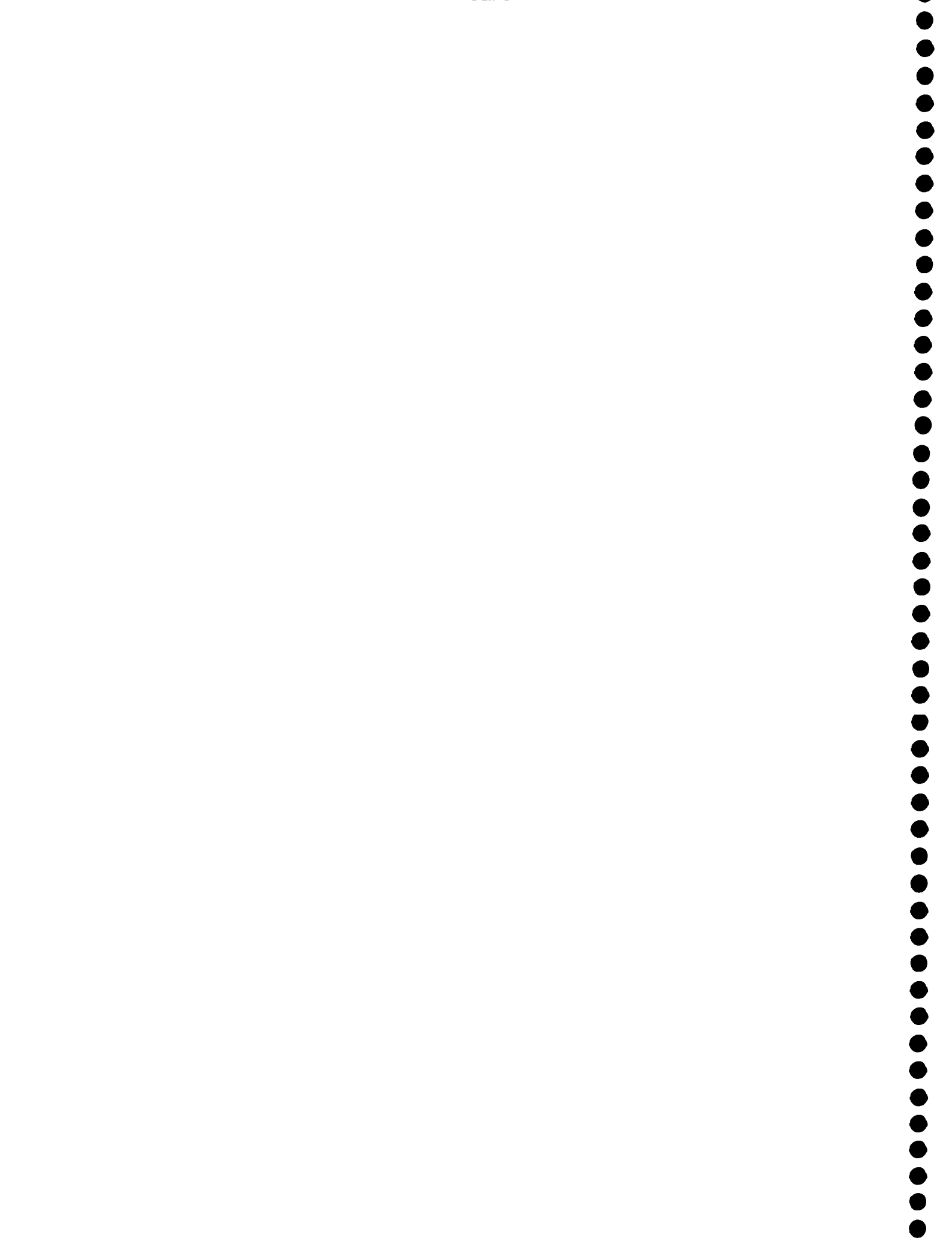
En este capítulo hemos visto que no hay evidencias experimentales de que se formen CTC entre las β -carbolinas y los compuestos halogenados usados.

En cambio, cuando las β -carbolinas se encuentran electrónicamente excitadas sí formarían excipletes con estos compuestos halogenados, proceso por el cual éstos actúan como quenchers de la fluorescencia de las primeras. Este quenching es de tipo dinámico y ocurriría principalmente a través de un proceso de transferencia electrónica de la β -carbolina excitada al compuesto halogenado. Al calcular la variación de energía libre asociada a dicho proceso, los valores obtenidos predicen que éstos son termodinámicamente factibles. Al usar el modelo de Marcus y de Rehm-Weller para modelar este sistema se pudieron obtener los datos de potencial de oxidación de las β -carbolinas en distintos solventes así como el valor de la barrera intrínseca de la reacción $\Delta G^\ddagger(0)$. A su vez con estos valores se obtuvieron las energías asociadas a la reorganización del solvente (λ) durante este proceso. Los valores de λ así obtenidos se compararon con aquéllos calculados teóricamente por medio de métodos semiempíricos siendo ambos similares. Esto indica que el modelo de quencheo propuesto que incluye una transferencia de electrones fotoinducida con formación del catión radical β -carbolínico es correcto.

Cuando se utilizaron altas concentraciones de CH_2Cl_2 , CHCl_3 y CCl_4 vimos que el proceso no estaba limitado por barreras térmicas sino más bien por barreras entrópicas y/o estéricas, modificando los dos últimos quenchers utilizados las propiedades del medio en donde se realiza la medición.

CAPÍTULO 4

REACCIÓN FOTOQUÍMICA DE LAS β -CARBOLINAS AROMÁTICAS



Introducción

Tiempo atrás en nuestro laboratorio se realizaron estudios⁷⁴ del comportamiento fotoquímico de algunas β -carbolinas aromáticas (*nor*-harmano, harmano y harmina) disueltas en CH_2Cl_2 , analizándose sólo los aspectos preparativos de esta reacción. Así, luego de 15 horas de irradiación de la solución (25 mg/50 ml, aproximadamente 3×10^{-3} M), en recipientes de Pyrex con una lámpara de Hg de alta presión (Sylvania o Phillips, 500 W) se obtenía: i) en el caso del *nor*-harmano, con un 82% de conversión, un 26% del dímero simétrico donde las unidades monoméricas están unidas por una unión σ N9-N9', ii) en el caso del harmano, con un 54% de conversión, un 8% del dímero simétrico y un 48% de un dímero asimétrico con una unión σ C3-N9' entre las unidades de β -carbolina y iii) en el caso de la harmina, con 56% de conversión, se obtenía menos de 3% del dímero simétrico y 75% del dímero asimétrico. En este trabajo se propuso que la reacción ocurriría desde el estado electrónico excitado triplete T_1 ($n-\pi^*$) el cual se estabilizaría formando el radical 9- β -carbolinilo por ruptura homolítica de la unión N-H. Luego este radical se deslocalizaría para dar origen al radical 3- β -carbolinilo. Por combinación de estos dos radicales se formarían entonces los dos tipos de dímeros aislados. Estos radicales serían bastante estables ya que la reacción fotoquímica no se veía afectada ni por la presencia de oxígeno molecular ni por la de iodo. Además en este estudio se observó una falta total de reactividad de las β -carbolinas en el caso de usar etanol o ácido acético como solventes. Si bien no se profundizó en el estudio de los aspectos fotofísicos de la reacción, se postuló que probablemente participara un catión radical formado a partir de la β -carbolina, la que en su estado electrónico excitado transferiría un electrón al CH_2Cl_2 .

Teniendo en cuenta estos antecedentes se decidió estudiar la fotorreactividad de las β -carbolinas en halometanos de mayor afinidad electrónica, seleccionándose para ello en primer lugar al CCl_4 . El problema experimental que se presentó es que las β -carbolinas son muy poco solubles en dicho solvente. Por esta razón se agregó etanol al medio con el objeto de aumentar la concentración de los alcaloides en la solución a irradiar. La elección del

etanol para aumentar la polaridad del medio pareció correcta ya que las β -carbolinas eran fotoestables en dicho solvente puro.

En la primera parte del presente estudio analizamos la interacción entre las β -carbolinas en el estado electrónico fundamental y los halometanos. Luego hicimos el mismo análisis con las β -carbolinas en el estado electrónico excitado singulete. Los resultados obtenidos por las espectroscopías electrónicas de absorción UV-vis, emisión y excitación fluorescentes (Capítulos 1 y 3) nos llevaron a proponer un esquema de reacción (Esquema 2, Capítulo 3) que no incluye la formación de complejos entre las β -carbolinas y los halometanos en el estado electrónico fundamental pero tiene en cuenta la formación de un exciplete, el cual no sería fluorescente. Además vimos que una vez formado éste es posible la transferencia de un electrón desde la β -carbolina al halometano. Este exciplete además puede desactivarse por varios caminos alternativos, siendo uno de ellos la reacción química propiamente dicha (paso 5 del Esquema 2). Por lo tanto en esta etapa decidimos estudiar los productos formados al irradiar las β -carbolinas aromáticas (*nor*-harmano, harmano y harmina) en presencia de un halometano, el CCl_4 , seleccionando como solventes a algunos de los compuestos previamente usados como tales en los estudios espectroscópicos (etanol y 2-propanol).

Al irradiar con una lámpara de mercurio de presión media, en un recipiente de cuarzo o de vidrio Pyrex, una β -carbolina aromática (rango de concentraciones usadas: 1×10^{-5} a 5×10^{-3} M) en los medios antes mencionados se observó la disminución de la concentración del reactivo original, al monitorear la reacción por espectroscopía de absorción UV-vis. (Parte Experimental E.7). Cabe señalar que no se observaba cambio alguno al irradiar la β -carbolina en el mismo solvente orgánico pero sin el agregado de CCl_4 ni tampoco en el caso de que la misma solución con el agregado de CCl_4 fuera mantenida en la oscuridad.

Considerando estos antecedentes, en una primera etapa se procedió a caracterizar e identificar los productos formados durante la irradiación, debiéndose para ello aislarlos y purificarlos.

4.1 Irradiación en escala preparativa de β -carbolinas en solución en presencia de CCl_4

4.1.1 Identificación de los productos principales de la reacción

Para estas experiencias se eligieron como modelos representativos de los medios de reacción los sistemas constituidos por mezclas de CCl_4 -etanol y se trabajó con concentraciones de β -carbolina del orden de 10^{-4} M. En todos los casos se observó la aparición de un precipitado blanco, caseoso, de difícil manipuleo, el cual fue necesario filtrar a través de embudos de vidrio sinterizado. El producto así separado se comportaba como una única mancha en ccd (sílica gel). De los datos obtenidos a partir de los espectros de absorción UV-vis, RMN- ^1H y ^{13}C , EM y ensayo de $\text{AgNO}_3/\text{HNO}_3$, se concluyó que se trataba del correspondiente clorhidrato, coincidiendo sus propiedades con las del respectivo clorhidrato generado por vía térmica. En las Figuras 38, 39 y 40 se muestran los espectros de RMN- ^1H de los clorhidratos generados por vía térmica y los de los productos obtenidos por vía fotoquímica. En todos los casos los fotoproductos fueron obtenidos con un rendimiento superior al 98 %. En forma complementaria, al producto aislado de la irradiación se lo disolvió en CH_2Cl_2 neutralizándose la solución con carbonato de sodio. De la suspensión así obtenida, las sales fueron separadas por filtración y el filtrado fue evaporado recobrándose el alcaloide original, cuyas propiedades coincidieron con las de la muestra auténtica detallándose éstas en la Parte Experimental E.7.1.1 (p.f., UV-vis y RMN).

Como puede verse en las Figuras mencionadas, al compararlas con los datos presentados en la Parte Experimental E.7.1.1 surge que la forma de las señales en los espectros de los clorhidratos es similar a la de la correspondiente base libre excepto que las señales se encuentran corridas hacia campos más bajos, debido a la diferente distribución de la densidad de carga atómica en la molécula como consecuencia de la protonación del N piridínico (ver Tabla 41, valores de densidades de carga calculados por PM3).

Figura 38 A

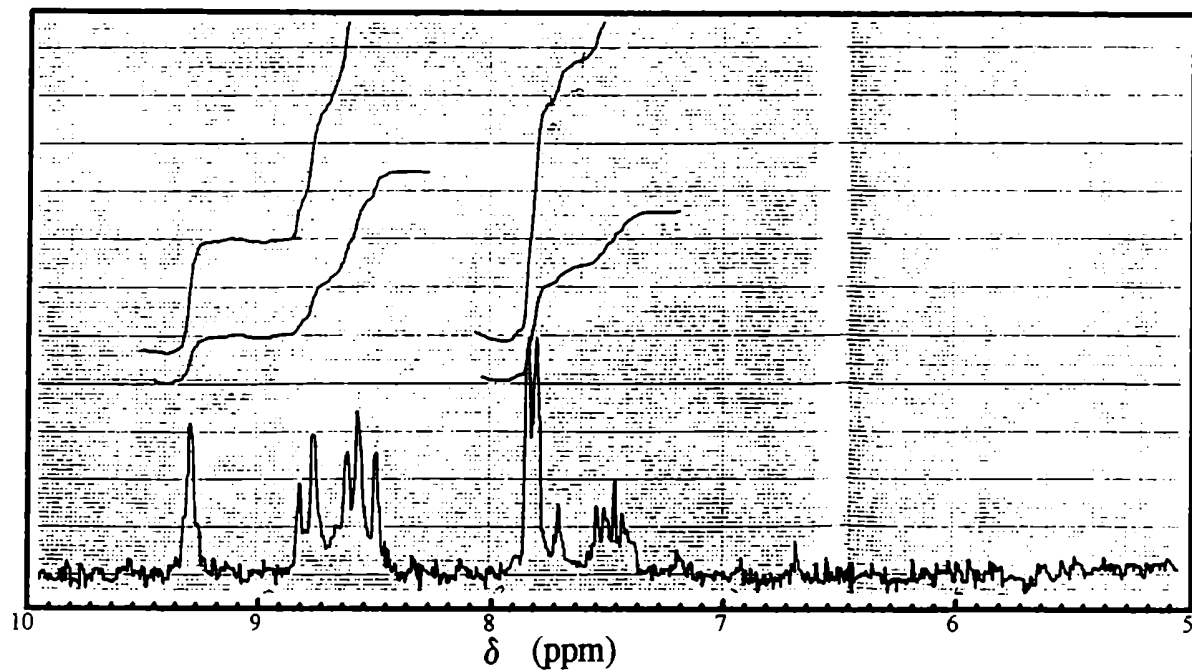


Figura 38 B

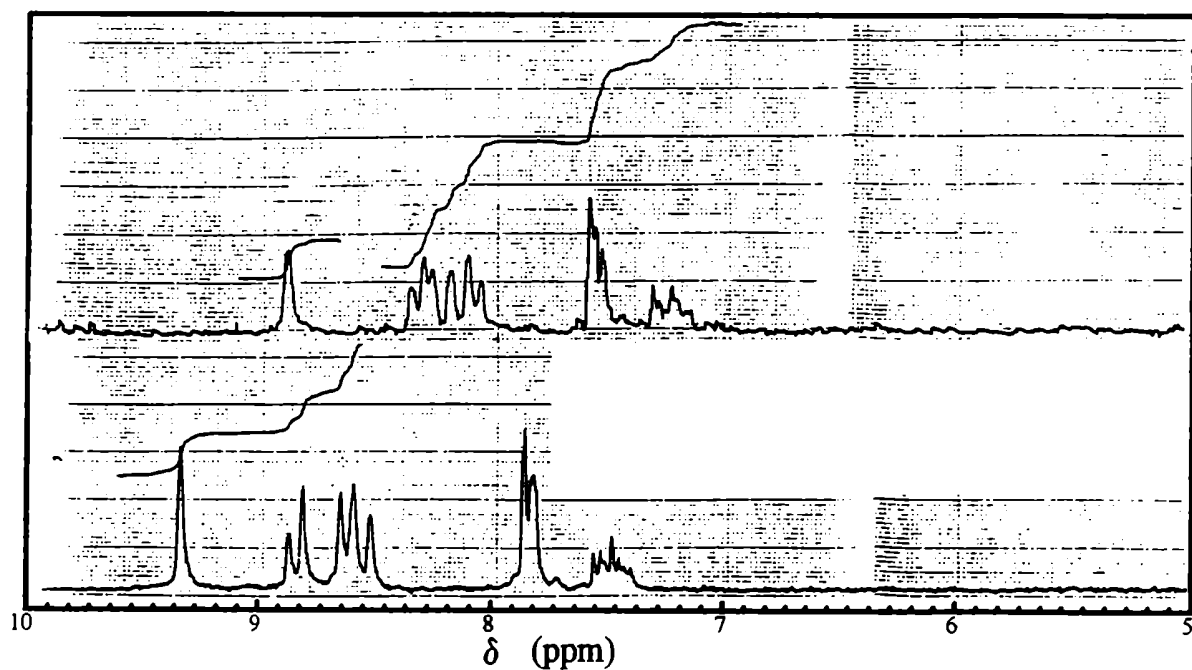


Figura 38 *nor*-Harmano. Espectros parciales de RMN- ^1H ; 38 A producto de la irradiación, 38 B arriba: alcaloide neutro, abajo: clorhidrato térmico (solvente: $\text{DMSO}-d_6$).

Figura 39 A

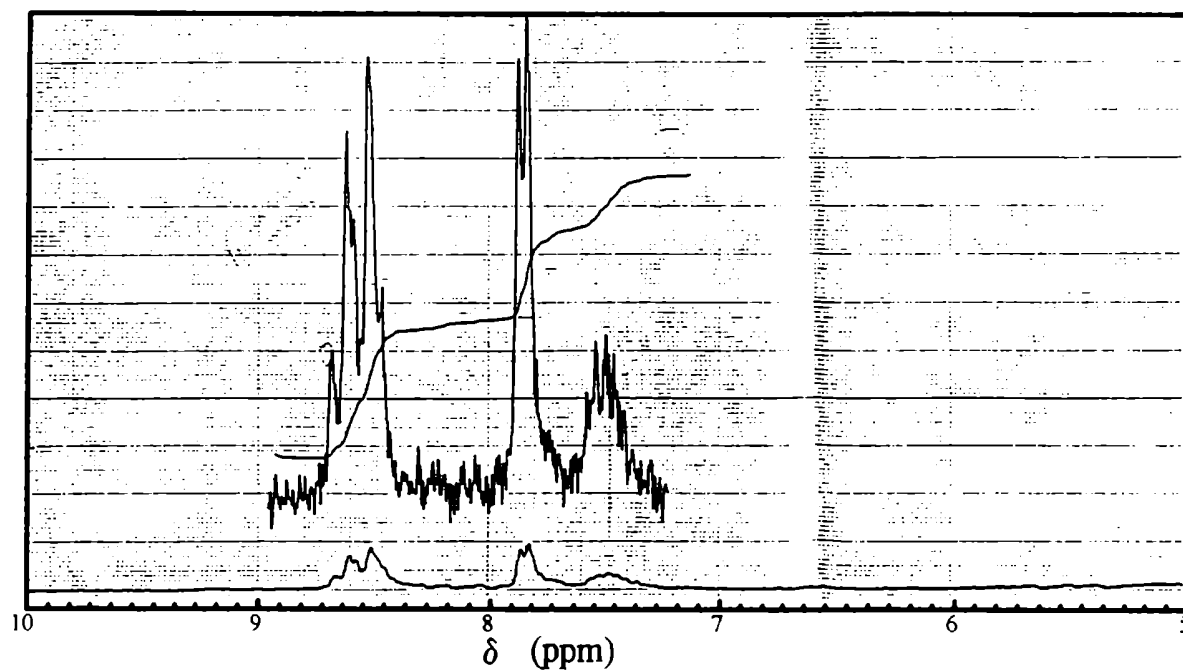


Figura 39 B

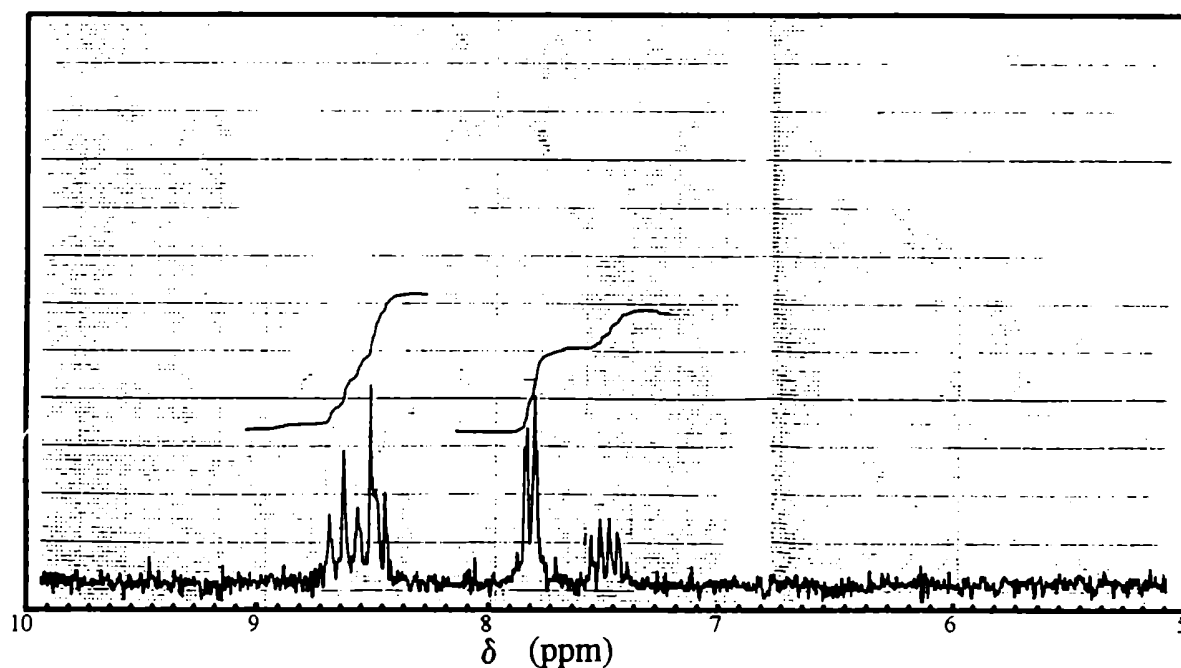


Figura 39 Harmano. Espectros parciales de RMN- ^1H ; **39 A** producto de la irradiación, **39 B** clorhidrato térmico (solvente: $\text{DMSO}-d_6$).

Figura 40 A

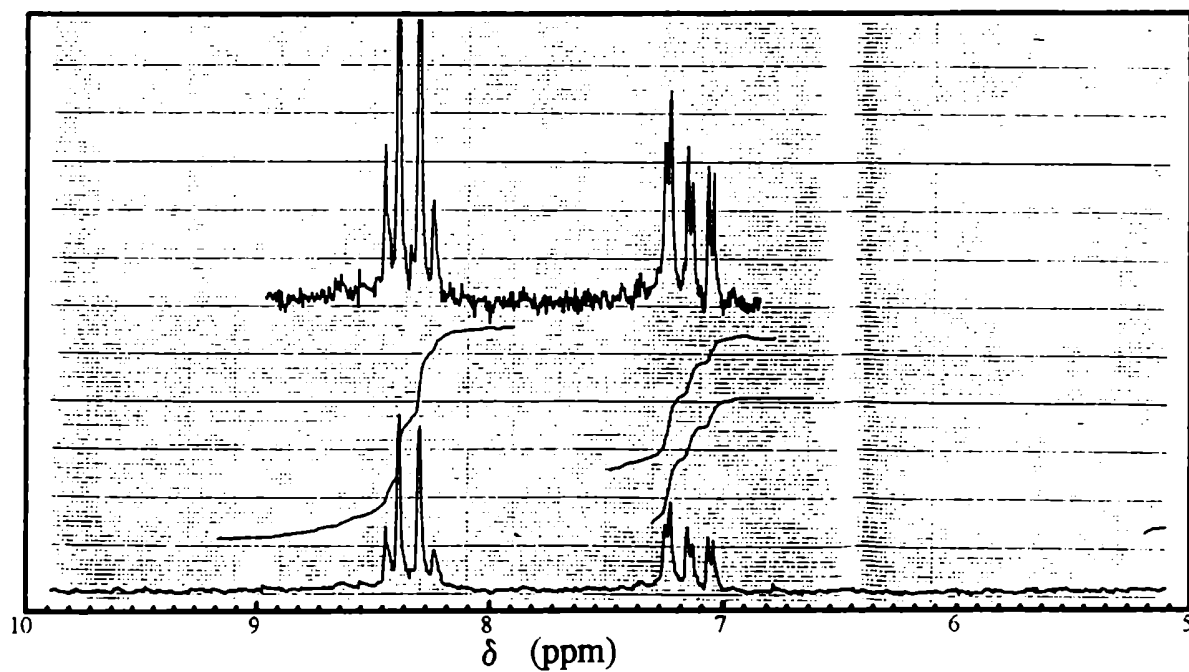


Figura 40 B

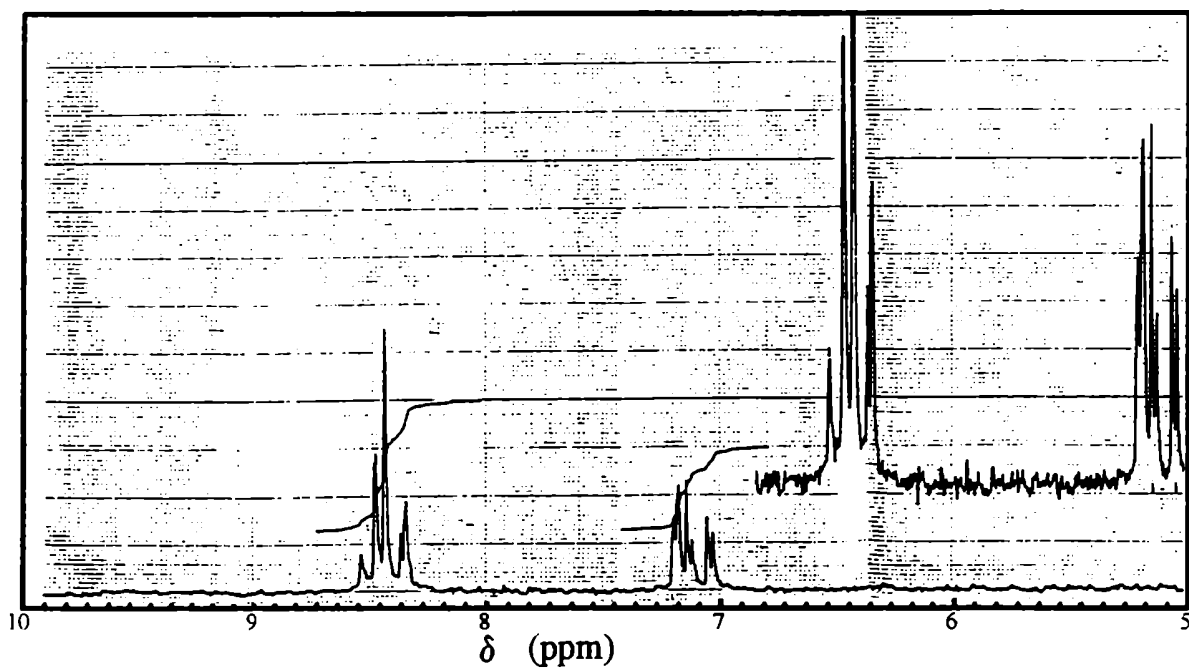


Figura 40 Harmina. Espectros parciales de RMN- ^1H ; **40 A** producto de la irradiación, **40 B** clorhidrato térmico (solvente: $\text{DMSO}-d_6$).

4.1.2 Caracterización e identificación de los productos secundarios de la reacción

La formación de posibles fotoproductos volátiles y productos secundarios de la reacción fue evaluada haciendo uso de la cromatografía gaseosa (cg). En este caso se usaron como modelo de mezclas de solventes soluciones de 2-propanol- CCl_4 1:1 (v:v) (sistema I) y de etanol- CCl_4 1:1 (v:v) (sistema II). El primer sistema se eligió ya que se había observado que la reacción ocurría más rápidamente en el mismo, como se explicará más adelante en la Sección referida a los Aspectos Cinéticos de la misma.

Así, cuando la reacción fue monitoreada por cg-EM, (concentración inicial de β -carbolinas alrededor de 10^{-3} M) se observaron nuevas señales no presentes en la solución original de β -carbolina. En las diferentes experiencias realizadas se observó que algunas de estas nuevas señales no dependían de la β -carbolina irradiada si no que eran características del solvente utilizado. En estas experiencias fue necesario trabajar con una concentración de β -carbolina un orden mayor que el usado en el resto de los estudios con el objeto de generar cantidades detectables, dentro de los límites de sensibilidad de las técnicas analíticas disponibles, de los productos secundarios de la reacción.

En el caso del sistema I, en la irradiación del *nor*-harmano, del harmano y de la harmina en atmósfera de nitrógeno, se observaron las mismas nuevas señales por cg. Estas señales resultaron ser cuatro. Del análisis de los espectros de masa obtenidos, los cuales se describen en detalle en la parte Experimental E.7.1.2, la primera señal ($t_r = 4,80$ min.) fue asignada al C_2Cl_6 . Las otras a las que denominaremos señal 236 ($t_r = 5,93$ min.), señal 264 ($t_r = 6,38$ min.) y señal 318 ($t_r = 7,30$ min.) no se pudieron asignar unívocamente. Si podemos decir que los EM son idénticos entre sí para la dos β -carbolinas analizadas por esta técnica, con lo cual se trataría de los mismos compuestos, siendo además productos de la reacción ya que no están presentes a tiempo = 0 y son volátiles ya que por ccd (sílica gel) no se los pudo detectar. Estos compuestos parecerían incorporar en su estructura unidades provenientes del alcohol y del CCl_4 .

Al irradiar estos mismos sistemas bajo atmósfera abierta se detectaron las mismas señales, a excepción de la de $t_r = 4,80$ min. correspondiente al C_2Cl_6 , la que no fue observada. Esto está de acuerdo con la participación del radical $\cdot CCl_3$ en procesos oxidativos para formar al radical $COOCl_3\cdot$, como se indica más adelante.

Cabe también señalar que haciendo uso de este sistema, sólo en una experiencia fue posible detectar un subproducto que incluía en su estructura la unidad β -carbolina. Este resultado se observó en el caso del *nor*-harmano donde se detectó la presencia de un carboisopropoxi éster en cantidad de trazas.

En los caso del sistema II, al trabajar bajo atmósfera de nitrógeno, se detectaron varios productos derivados del solvente los que aparecen en las irradiaciones de los tres alcaloides. La estructura de los mismos no fue unívocamente determinada ya que no pudieron ser aislados debido a que se formaban en muy poca cantidad. Del análisis de los espectros de masa se deduce que se trata de compuestos de naturaleza polimérica, donde una de las unidades repetitivas sería el grupo $CH_3CHOH-CH_3CHOH$ (m/z 90). Al efectuar las irradiaciones bajo atmósfera abierta estos productos no fueron detectados.

En el caso del *nor*-harmano, bajo atmósfera de nitrógeno, con conversión mayor del 90% al correspondiente clorhidrato (monitoreo por absorción UV-vis.: no se observaba más base libre), se detectaron trazas de *nor*-harmano y un carboetoxi éster. Bajo atmósfera abierta se detectó una mayor cantidad del carboetoxi-*nor*-harmano simultáneamente con trazas de un cloro-*nor*-harmano, el que fue caracterizado por el M^{+} correspondiente.

En el caso del harmano, bajo atmósfera de nitrógeno, también con conversión mayor del 90% al correspondiente clorhidrato se detectaron trazas de harmano, cloro-harmano y un carboetoxi éster. Bajo atmósfera abierta se encontraron tres señales definidas que según sus espectros de masa corresponderían a otros tantos monoclono-harmanos.

También por cg-EM, haciendo uso de las mismas condiciones experimentales, se analizaron los crudos de reacción provenientes de la cloración térmica de *nor*-harmano y

harmano usando N-clorobenzotriazol (ver Parte Experimental E.9). En el caso del *nor*-harmano se encontraron señales correspondientes a dos cloro-*nor*-harmanos diferentes, uno de los cuales coincidía en tiempo de retención y tipo de rupturas con el obtenido fotoquímicamente. En el caso del harmano se lograron identificar dos señales por cg cuyos espectros de masa indican que se tratarían de dos cloro-harmanos diferentes. Estos cloro-harmanos presentaron rupturas similares a las de los cloroderivados obtenidos en la reacción fotoquímica, si bien uno sólo de ellos coincidía en el tiempo de retención con éstos.

En el caso de la harmina, con conversión mayor del 90 % al correspondiente clorhidrato, se detectaron en la irradiación bajo atmósfera de nitrógeno trazas de cloro-harmina y bajo atmósfera abierta trazas de cloro-harmina y de harmina.

Resumiendo: analizando los subproductos de la irradiación, en el caso del *nor*-harmano se detectaron los carboalcoxi ésteres y apenas trazas de producto clorado, en el del harmano se encontraron los dos tipos de compuestos en proporciones similares y finalmente en el caso de la harmina sólo los correspondientes productos clorados.

Los carboalcoxi ésteres provendrían de la reacción de la β -carbolina con el fosgeno (COCl_2 , agente formilante¹⁰⁴) o con el radical $\text{COOCl}_3\cdot$, los cuales se forman en el medio de reacción a partir de la reacción del radical $\cdot\text{CCl}_3$ con oxígeno molecular. Los productos clorados encontrados a nivel de trazas se formarían tanto a partir de la reacción del catión radical de la β -carbolina con el ion Cl^- en la caja de solvente como por la combinación de la β -carbolina en el estado fundamental con un radical $\text{Cl}\cdot$, formado a partir de la descomposición del radical $\cdot\text{CCl}_3$, del fosgeno y de la descomposición del CCl_4 por el mecanismo de transferencia de energía. Estas posibilidades se plantean esquemáticamente en la sección 4.4.1. Este mecanismo también explicaría la distribución de subproductos observada: cuanto más fácilmente oxidable sea la β -carbolina, mayor es su facilidad para formar el catión radical, el que luego daría origen a los cloro-derivados, si bien se debe recordar que se detectaron en todos los casos en cantidades ínfimas.

Teniendo en cuenta las densidades de carga de cada átomo calculadas por el método semiempírico PM3 para las moléculas de β -carbolinas en sus formas neutra, protonada y catión radical los sitios preferidos para un ataque electrofílico y uno nucleofílico se describen en la Tabla 34

Tabla 34. Sitios favorecidos para la sustitución nucleofílica y electrofílica en distintas formas de las β -carbolinas aromáticas.

β -Carbolina	Forma	Sustitución nucleofílica	Sustitución electrofílica
<i>nor</i> -Harmano	neutra	C-5, C-1, C-7	C-6, C-8
	catión	C-4, C-5, C-7	C-3, C-1
	catión radical	C-1, C-3, C-8	C-7, C-4, C-6
Harmano	neutra	C-5, C-7	C-6, C-8, C-4
	catión	C-4, C-5, C-7	C-3
	catión radical	C-3, C-8	C-7, C-4
Harmina	neutra	C-5	C-8, C-6, C-4
	catión	C-4	C-3, C-8
	catión radical	C-4	C-8, C-4

Si la formación de los derivados clorados fotoquímicos ocurre vía la formación del catión radical con posterior ataque del cloruro dentro de la caja del solvente, en el caso del *nor*-harmano se formarían preferentemente los 1-cloro, 3-cloro y 8-cloro-derivados, en el del harmano el 3-cloro y 8-cloro-derivados (ya que la posición 1 está sustituida por un metilo) y en el de la harmina el 4-cloro-derivado (en este caso están ocupadas las posiciones 1 y 7).

Además, se sabe que la reacción de halogenación térmica con N-clorobenzotriazol transcurre *vía* una sustitución electrofílica sobre la molécula neutra²³ con lo cual en el caso del *nor*-harmano se formarían preferentemente el 6-cloro y el 8-cloro-derivados, en el del harmano el 6-cloro, 8-cloro y 4-cloro-derivados y en el de la harmina el 8-cloro, 6-cloro y 4-cloro-derivados (en este caso está ocupada la posición 7).

Una reacción de formación de cloro- β -carbolinas por reacción del radical Cl con la β -carbolina neutra daría una distribución de productos similar a la de la proveniente de la sustitución electrofílica sobre la molécula neutra.

La formación de los carboalcoxi ésteres podría ocurrir como un ataque electrofílico del fosgeno formado a partir del $\cdot\text{CCl}_3$ o del radical $\text{Cl}_3\text{COO}\cdot$. Los productos más probables serían en el caso del *nor*-harmano si la reacción ocurre sobre la especie neutra el 6-carboalcoxi-derivado, si es sobre la especie catiónica el 3-carboalcoxi-derivado; en el caso del harmano si la reacción ocurre sobre la especie neutra el 6-carboalcoxi-derivado, si es sobre la especie catiónica el 3-carboalcoxi-derivado; en el caso de la harmina si la reacción ocurre sobre la especie neutra el 8-carboalcoxi-derivado, si es sobre la especie catiónica el 3-carboalcoxi-derivado (ver densidades de carga calculadas por PM3, Tabla 41, Parte Experimental E.14).

La detección de subproductos más volátiles que los antes mencionados se vio dificultada porque, aun utilizando la columna capilar más conveniente, estos tienen un tiempo de retención similar al del solvente orgánico empleado, el cual está siempre en mucha mayor proporción. Pese a estos problemas se pudo detectar en el caso de las mezclas 2-propanol- CCl_4 tanto C_2Cl_6 como CHCl_3 y en el caso de las mezclas con etanol, C_2Cl_6 , CHCl_3 , 1,2-dietoxietano y acetaldehído.

4.1.3 Generación térmica de radicales $\cdot\text{CCl}_3$

La presencia de radicales $\cdot\text{CCl}_3$, en el medio de reacción está evidenciada directamente por la formación de C_2Cl_6 y CHCl_3 e indirectamente por la formación de trazas de carboalcoxi ésteres derivados de las β -carbolinas. Como surge de las secciones anteriores no se observó en ninguna de las irradiaciones estudiadas cantidades detectables de productos que incluyan en su estructura la unidad β -carbolina y la unidad CCl_3 como tal simultáneamente.

Con el objeto de evaluar la posible reacción entre las β -carbolinas y los radicales del tipo $\cdot\text{CCl}_3$, se procedió a la generación de los mismos por vía térmica. A continuación se presentan los resultados obtenidos al analizar las mezclas de reacción obtenidas en cada experiencia haciendo uso de la técnica de cg-EM. El detalle de la técnica seguida en la preparación de cada una de las soluciones se presenta en la Parte Experimental E.10.

La *solución 1* (reactivos: naftaleno + peróxido de benzoilo (PB) + EtOH) mostró sólo la presencia de naftaleno (C_{10}H_8 , $\text{M}^{+\cdot}$ m/z 128);

La *solución 2* (reactivos: naftaleno + CCl_4 + PB + EtOH) mostró la presencia de CCl_2CCl_2 , benceno, naftaleno, ditriclorometilo-naftaleno ($\text{C}_{12}\text{H}_8\text{Cl}_6$, $\text{M}^{+\cdot}$ m/z 362) y cloro-triclorometilo-naftaleno ($\text{C}_{11}\text{H}_8\text{Cl}_4$ m/z 280);

La *solución 3* (reactivos: *nor*-harmano (N-H) + PB + EtOH) mostró la presencia de *nor*-harmano ($\text{C}_{11}\text{H}_8\text{N}_2$, $\text{M}^{+\cdot}$ m/z 168), ácido benzoico y trazas de productos de descomposición del PB (por ejemplo: PhCOCOPh);

Finalmente la *solución 4* (reactivos: N-H + CCl_4 + PB + EtOH) mostró la presencia de N-H ($\text{C}_{11}\text{H}_8\text{N}_2$, $\text{M}^{+\cdot}$ m/z 168), trazas de productos de descomposición del PB (ácido benzoico, PhCOCOPh) y trazas de carboetoxi *nor*-harmano ($\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_2$, $\text{M}^{+\cdot}$ m/z 240).

El análisis de los cromatogramas obtenidos con cada muestra, descriptos en la Parte Experimental E.10, revela que en el caso del naftaleno se observó la formación de los

derivados que incluyen Cl y CCl_3 en su estructura. En cambio en el caso del *nor*-harmano éste fue recuperado al final de la reacción casi en su totalidad detectándose sólo trazas del carboetoxiderivado. Es decir que aun en un medio donde la concentración de $\cdot\text{CCl}_3$ es suficientemente alta como para reaccionar con el naftaleno, este radical no forma aductos estables con la β -carbolina.

Cabe señalar que el carboetoxi éster del *nor*-harmano probablemente sea de estructura similar al que proviene de la reacción fotoquímica, ya que ambos se formarían a partir de la reacción con el fosgeno formado a partir del radical $\cdot\text{CCl}_3$ o bien de la reacción del radical $\text{COOCCl}_3\cdot$ con la β -carbolina neutra. La posible reacción en la caja del solvente del catión radical de la β -carbolina con el radical $\cdot\text{CCl}_3$ y su posterior oxidación y esterificación parecería muy poco eficiente.

4.1.4 Determinación de las eficiencias cuánticas de formación de cloruros y de protones

El método utilizado para la detección de iones cloruro (electrodo específico de Cl^-) no resulta suficientemente exacto como para detectar si se produce un mol o dos moles de iones Cl^- por cada mol de β -carbolina consumida durante la irradiación debido a problemas propios de la técnica de preparación de la muestra donde se efectúa el dosaje (ver Parte Experimental E.11).

Debido al carácter básico de los sustratos irradiados, la eficiencia cuántica de formación de protones no es posible medirla en forma independiente de la formación de β -carbolina protonada. Esto se debe a que a medida que se generan protones éstos son atrapados por la β -carbolina neutra, por lo tanto el protón se determina bajo la forma de catión de la β -carbolina.

Tabla 35 Eficiencias cuánticas de formación de Cl^- y producto en mezclas de $\text{ROH}:\text{CCl}_4$ 1:1 (v:v), irradiadas en atmósfera de N_2 .

β -Carbolina	Concentración inicial de β -carbolina(a)	ROH	Conversión (%) (b)	$\phi_{\text{Cl}^-} / \phi_{\text{P}}$
<i>nor</i> -Harmano	$4,9 \times 10^{-3}$	EtOH	7	14,6
			72	2,3
			100	5,1
			100(c)	14,7
	$6,4 \times 10^{-3}$	MeOH	24	2,4
			31	2,4
			63	2,0
			74	2,4
	$6,0 \times 10^{-3}$	i-PrOH	31	0,3
			54	0,2
			70	0,5
			71	0,7
			83	0,9
Harmano	$5,1 \times 10^{-3}$	EtOH	44	0,6
			92	1,4
			100	4,0
	$4,9 \times 10^{-3}$	i-PrOH	17	9,7
			62	3,3
			86	3,5
			100	4,2
			100(c)	6,8
Harmina	$4,1 \times 10^{-3}$	i-PrOH	51	2,2
			67	2,0
			76	8,3

(a) en M; (b) porcentaje de reactivo consumido, monitoreado por espectroscopía de absorción UV-vis; (c) valores obtenidos luego de irradiar 30 minutos más la solución con 100% de conversión.

Como puede observarse en la Tabla 35 la eficiencia cuántica de formación de iones cloruro (ϕ_{Cl^-}) es, en términos generales, similar a la de formación del producto no volátil (clorhidrato). Según se desprende de los datos de la misma Tabla mientras que por espectroscopia de absorción UV-vis se detecta aún la β -carbolina como tal, no existe en el medio de reacción una concentración de iones cloruro tal que haga pensar en una producción de los mismos por un mecanismo en cadena en forma apreciable. Existen algunos valores que no siguen esta tendencia. Uno es el valor en el caso del *nor*-harmano en etanol con conversión del 7 %; esta anomalía se puede explicar teniendo en cuenta que el grado de conversión es pequeño con lo cual la cantidad de iones cloruro formada es pequeña y hay un mayor error en la medición. Los otros valores particulares son los que se presentan a distintos tiempos de irradiación luego de la conversión total de la materia prima. Estos indicarían que se siguen produciendo iones cloruros una vez consumida toda la β -carbolina neutra. Por ello se decidió hacer experiencias tanto en atmósfera de nitrógeno como aire tomando muestras a distintos tiempos luego de alcanzar el 100% de conversión de materia prima. Los datos obtenidos se presentan en la Tabla 36.

Tabla 36 Eficiencias cuánticas relativas de formación de Cl^- y de producto al irradiar soluciones de **harmano** en mezclas de i-PrOH:CCl₄ 1:1 (v:v).

Concentración inicial de harmano(a)	Atmósfera	Tiempo de irradiación luego del 100 % de conversión (min.)	pH(b)	$\phi_{Cl^-}(b) / \phi_p(c)$
4,7x10 ⁻³	O ₂	0	2,8	5,7
		30	2,6	9,0
		60	2,6	7,5
		90	2,4	12,3
5,1x10 ⁻³	N ₂	0	2,8	5,5
		30	2,7	6,2

		60	2,6	6,4
		90	2,5	8,7
5,1x10 ⁻³	O ₂	0	3,1	1,3
		60	2,8	2,5
5,2x10 ⁻³	N ₂	0	3,4	0,6
		60	2,7	3,4

(a) en M, (b) monitoreados con electrodos específicos, (c) 100% de reactivo consumido, monitoreado por espectroscopía de absorción UV-vis.

Como se muestra en la Tabla 36 al realizar las experiencia tanto bajo atmósfera de nitrógeno como en presencia de oxígeno, se observó que una vez que la β -carbolina neutra ha sido consumida totalmente se produce un leve descenso del pH del medio así como también un aumento de la concentración de iones Cl⁻ en el mismo. Esto podría deberse a que la β -carbolina protonada es capaz de sensibilizar la descomposición del CCl₄ en presencia de alcoholes, lo que surge de experiencias realizadas con tal fin (ver Parte Experimental E.11 y E.12).

4.2 Reacción fotoquímica entre las β -carbolinas aromáticas y CHCl₃

Considerando que el CHCl₃ puede actuar como aceptor de electrones, que la transferencia electrónica fotoinducida desde una β -carbolina aromática al mismo es factible termodinámicamente (como se indica en el Capítulo 3) y que además la misma molécula de CHCl₃ presenta un hidrógeno ácido en su estructura, se decidió irradiar soluciones de β -carbolinas disueltas en este solvente halogenado según lo detallado en la Parte Experimental 7.2. Al irradiar soluciones de *nor*-harmano, harmano y harmina (1x10⁻⁴ M) con una lámpara

de Hg de baja presión Hanau TNN 1542, usando recipientes de cuarzo, se observó al monitorear la reacción por espectroscopía de absorción UV-vis, que se formaba la correspondiente forma protonada (clorhidrato).

Cuando soluciones de *nor*-harmano ($1,19 \times 10^{-4}$ M) fueron también irradiadas en la presencia de típicos atrapantes de radicales : i) naftaleno (relación molar 10:1) y ciclohexeno (relación molar 10:1), monitoreando el progreso de la reacción de la manera habitual (espectroscopía de absorción UV-vis), no se observaron cambios respecto de la solución testigo irradiada (sin agregado de atrapantes). En el caso del naftaleno, el residuo sólido obtenido luego de evaporar el solvente a presión reducida fue analizado por espectroscopia de masa observándose señales correspondientes a las estructuras de: cloro-triclorometil-naftaleno, triclorometil-naftaleno, diclorometil-naftaleno, naftaleno y *nor*-harmano, los que se describen en la Parte Experimental E.7.2.1.

En este caso así como en el caso de usarse como medio de reacción mezclas de CCl_4 -RH tampoco se detectaron productos que presenten en su estructura las unidades β -carbolina y CCl_3 simultáneamente.

4.3 Irradiación en escala preparativa de β -carbolinas en presencia de CH_2Cl_2

Con fines comparativos también estudiamos la reacción usando como aceptor de electrones al CH_2Cl_2 . Como es sabido este halometano es mucho menos aceptor de electrones que el CCl_4 o CHCl_3 (ver valores de E_{red}^0 , Tabla 29) y su hidrógeno es menos ácido que el de este último (α Taft CH_2Cl_2 : 0,13 y CHCl_3 : 0,20⁵³)

Cuando se realizó la irradiación del *nor*-harmano con lámpara de Hg de presión media Hanau TQ 150 en soluciones de CH_2Cl_2 (6×10^{-3} M) en recipiente de Pyrex, aun luego de 24 hs, no se observó ningún producto por ccd (sílica gel) (Parte Experimental E.7.3). Según lo informado anteriormente⁷⁴ luego de 1 hora de irradiación, pero con una lámpara de Hg de

alta presión y alta potencia, se comenzaba a observar una señal con R_f mayor que el compuesto de partida la que correspondía al producto dimérico. Para analizar los posibles productos formados, se evaporó el solvente. Al sólido obtenido se lo disolvió en etanol y se realizaron los espectros electrónicos de absorción UV-vis y de emisión y excitación fluorescentes. Estos revelaron que se trataba de una mezcla del alcaloide en sus formas neutra y protonada. El análisis de los espectros de absorción UV-vis. y de RMN- ^1H (Figura 41) indicó que se trataba mayoritariamente del compuesto de partida, siendo la conversión del orden del 10 %. Al compararlo con los espectros de los dímeros éste resultó ser completamente distinto.

También se realizaron irradiaciones con la lámpara de Hg de presión baja del *nor*-harmario (6×10^{-5} M) disuelto en mezclas CH_2Cl_2 -EtOH 10:1 (v:v), 1:1 (v:v) y 1:10 (v:v) en recipientes de cuarzo. En todos los casos el producto obtenido luego de 4 horas de irradiación resultó ser el alcaloide protonado (clorhidrato), según lo indicado por los espectros de absorción UV-vis correspondientes.

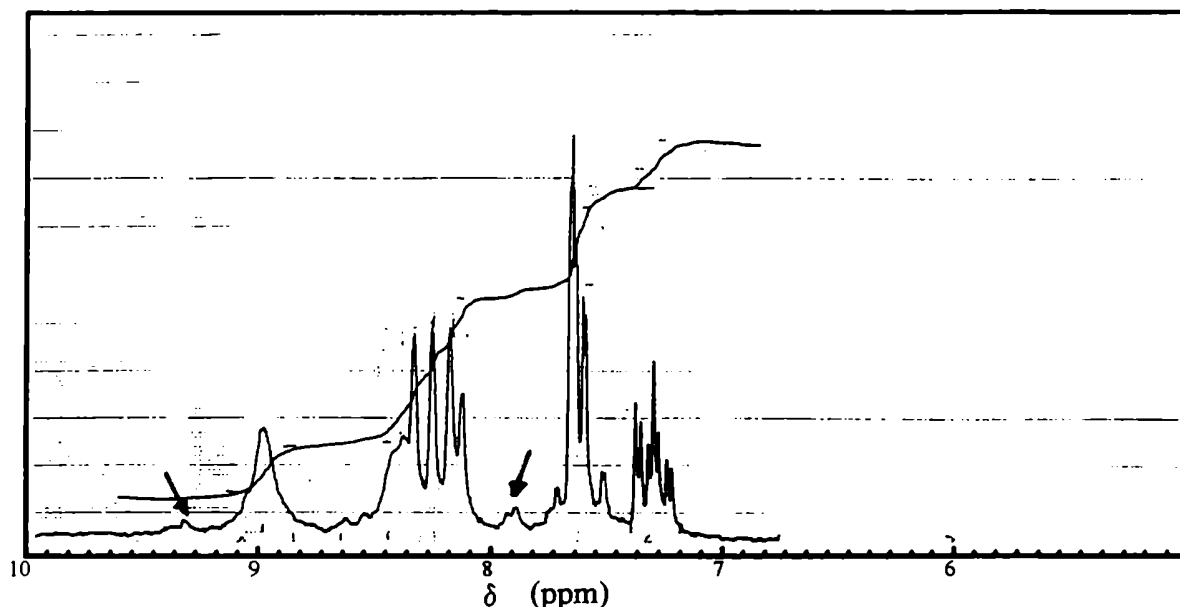


Figura 41 Irradiación del *nor*-harmario disuelto en CH_2Cl_2 con lámpara de Hg de presión media (recipiente de vidrio Pyrex). Espectro parcial de RMN- ^1H del crudo de la reacción, en $\text{DMSO}-d_6$. Las flechas señalan las señales del fotoproducto (clorhidrato), ver Figura 38.

4.4 Aspectos cinéticos

4.4.1 Reacción fotoquímica en presencia de CCl_4

Hemos visto que al irradiar las β -carbolinas en el sistema RH-CCl_4 se obtiene como producto mayoritario, con un rendimiento superior al 98 %, el correspondiente clorhidrato, efectuando las experiencias tanto bajo atmósfera de nitrógeno como atmósfera de aire. Al monitorear con espectroscopía de absorción UV-vis el desarrollo de la reacción fotoquímica de estos alcaloides en los distintos medios orgánicos utilizados, observamos que la señal correspondiente a la β -carbolina neutra disminuía y aumentaba la correspondiente a la forma protonada de la misma. Dada la reproducibilidad del comportamiento fotoquímico del harmano en la mezcla EtOH-CCl_4 1:1 (v:v), los rendimientos cuánticos de la desaparición de reactivo Φ_B en las otras experiencias fueron medidos usando a éste como actinómetro, siguiendo para ello la técnica descrita en la Parte Experimental E.12.1, teniendo la precaución que la conversión de la materia prima no fuera mayor a un 20 %. A su vez Φ_B del harmano había sido previamente medido usando como actinómetro el ferrioxalato de potasio siguiendo la técnica de Parker¹⁰⁵ según lo detallado en la Parte Experimental E.12.1.

Con el objeto de poder proponer un posible mecanismo de reacción, se realizaron experiencias en distintas condiciones determinando Φ_B en cada caso.

Si bien el producto principal de la irradiación es el mismo tanto en atmósfera de nitrógeno como de aire, su velocidad de aparición varía notablemente.

Cuando se realizaron las irradiaciones de soluciones de β -carbolina en un solvente RH , bajo atmósfera de nitrógeno, con cantidades variables de CCl_4 se observó que la eficiencia de las mismas era tan alta que la luz incidente durante la realización de las mediciones en el espectrómetro UV-vis utilizado era suficiente para producir la reacción.

Por este motivo se decidió cambiar las condiciones de la reacción y realizar experiencias usando un solvente inerte desde el punto de vista de la reacción fotoquímica variando ahora la concentración de RH. Un solvente adecuado resultó ser el ciclohexano. Se realizaron una serie de irradiaciones en soluciones de ciclohexano- CCl_4 1:1 (v:v) bajo atmósfera de N_2 con agregados de pequeños volúmenes de alcohol (RH), como se describe en la Parte Experimental 12.2. En estas experiencias los alcoholes utilizados fueron metanol, etanol y 2-propanol. En el caso del metanol y del etanol se observaron los resultados habituales: disminución de la señal correspondiente a la especie neutra respondiendo ésta a una cinética de primer orden. En el caso del 2-propanol también se observó la disminución de la señal de la especie neutra durante el transcurso de la reacción. Pero los espectros UV-vis., aun a bajas conversiones de materia prima, mostraban indicios de la presencia de partículas en suspensión, observándose un aumento notable en el valor de la absorbancia de la línea de base, con lo cual no se pudieron determinar los valores de Φ_B en la forma habitual. Estas partículas en suspensión se deberían simplemente al clorhidrato, el cual es muy poco soluble en la mezcla 2-propanol- CCl_4 1:1 (v:v).

Al graficar $1/\Phi_B$ vs $1/[\text{RH}]$ se obtuvieron rectas, las que se muestran en la Figura 42.

En atmósfera de aire, se realizaron experiencias irradiando soluciones de *nor*-harmano y de harmano en etanol y en acetonitrilo, con agregados de distintas cantidades de CCl_4 , sabiendo que la naturaleza del producto obtenido en la irradiación de estas dos β -carbolinas en ambos solventes no depende de la concentración de CCl_4 . Se observaron en todos los casos los resultados esperados: disminución de la señal correspondiente a la especie neutra, siguiendo ésta una cinética de primer orden.

Si se grafica $1/\Phi_B$ vs $1/[\text{CCl}_4]$ se obtiene rectas como se puede ver en la Figura 43.

El conjunto de resultados obtenidos en el presente trabajo de Tesis tales como naturaleza de los productos principales y subproductos identificados en la reacción

fotoquímica, rendimientos cuánticos de formación de producto y eficiencias cuánticas de formación de iones Cl^- conjuntamente con los datos de las constantes cinéticas observadas en las diferentes condiciones experimentales son consistentes con un mecanismo del tipo delineado en el Esquema 4.

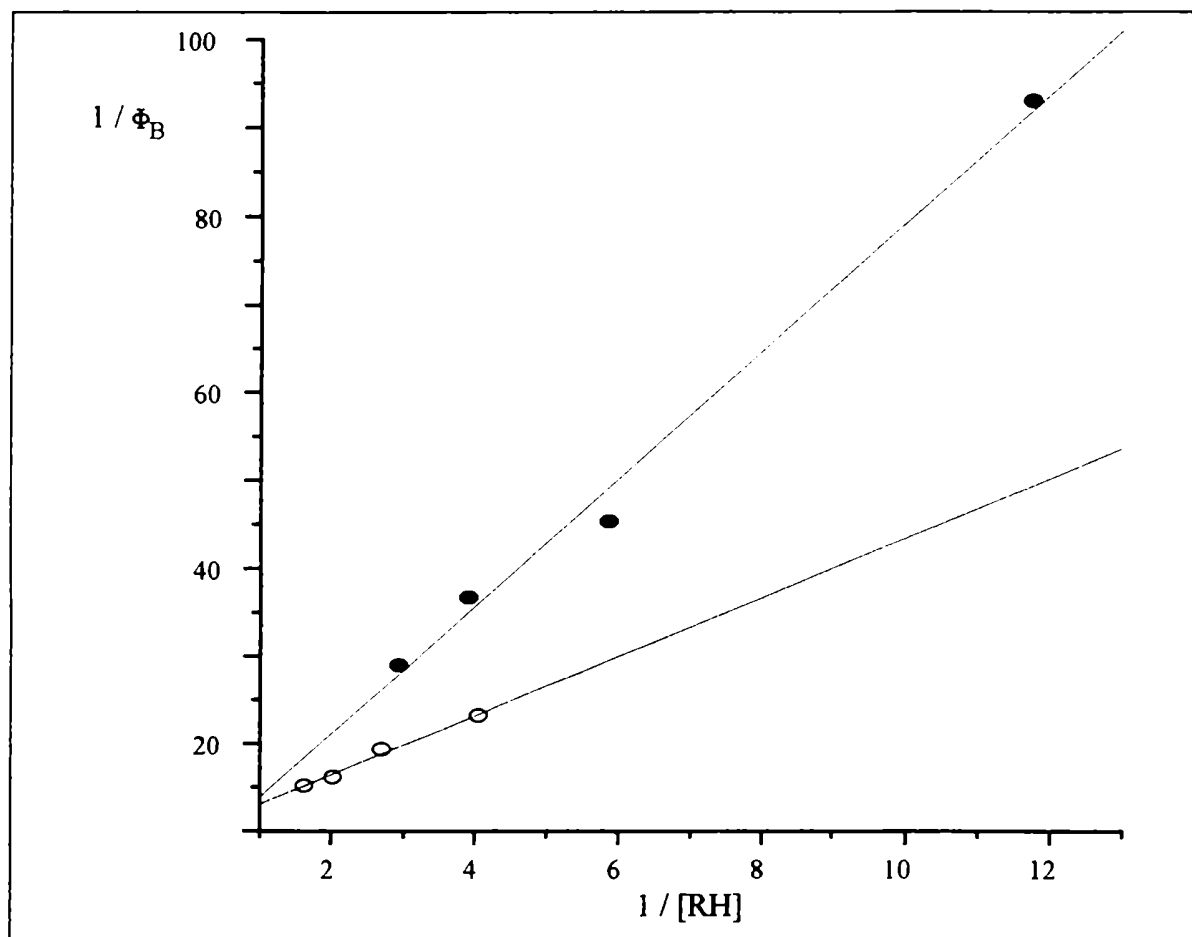


Figura 42 $1/\Phi_B$ en función de $1/[RH]$. **Harmano** ($5,0 \times 10^{-5}$ M) en ciclohexano- CCl_4 (1:1 v:v) con agregados de RH. RH = EtOH (●) y RH = MeOH (○). Irradiaciones en atmósfera de N_2 .

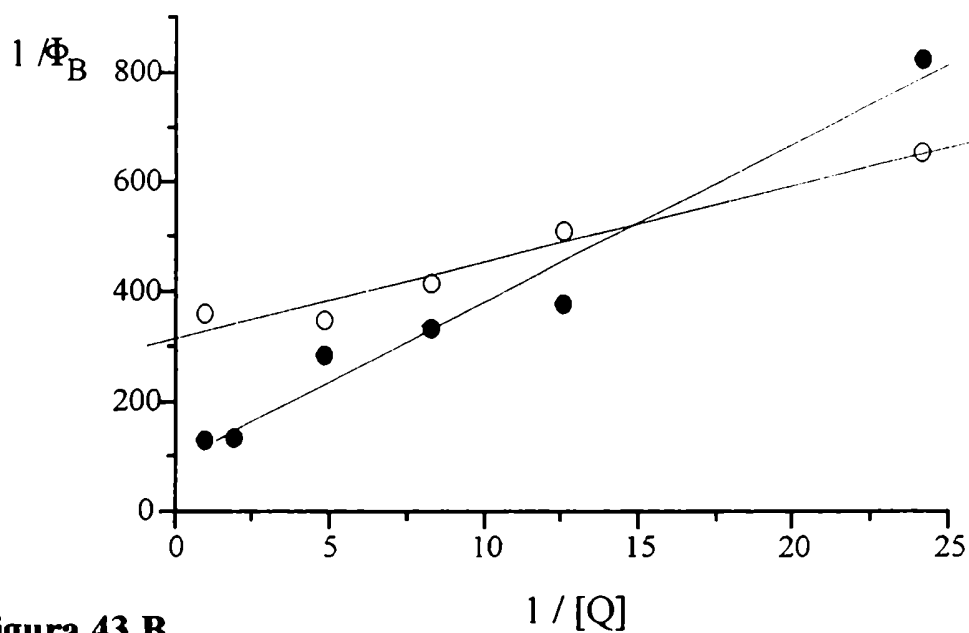
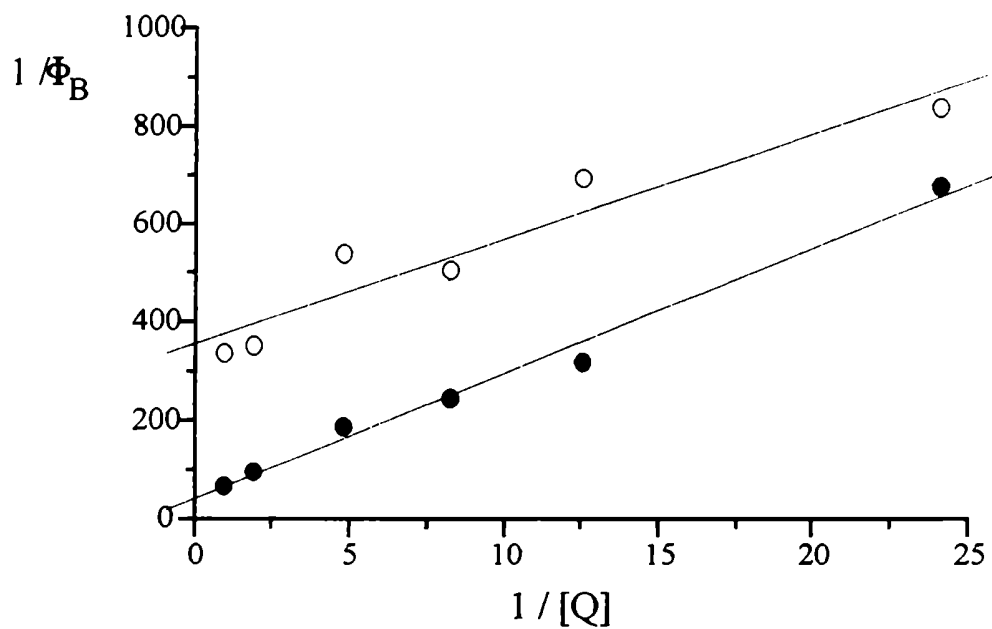
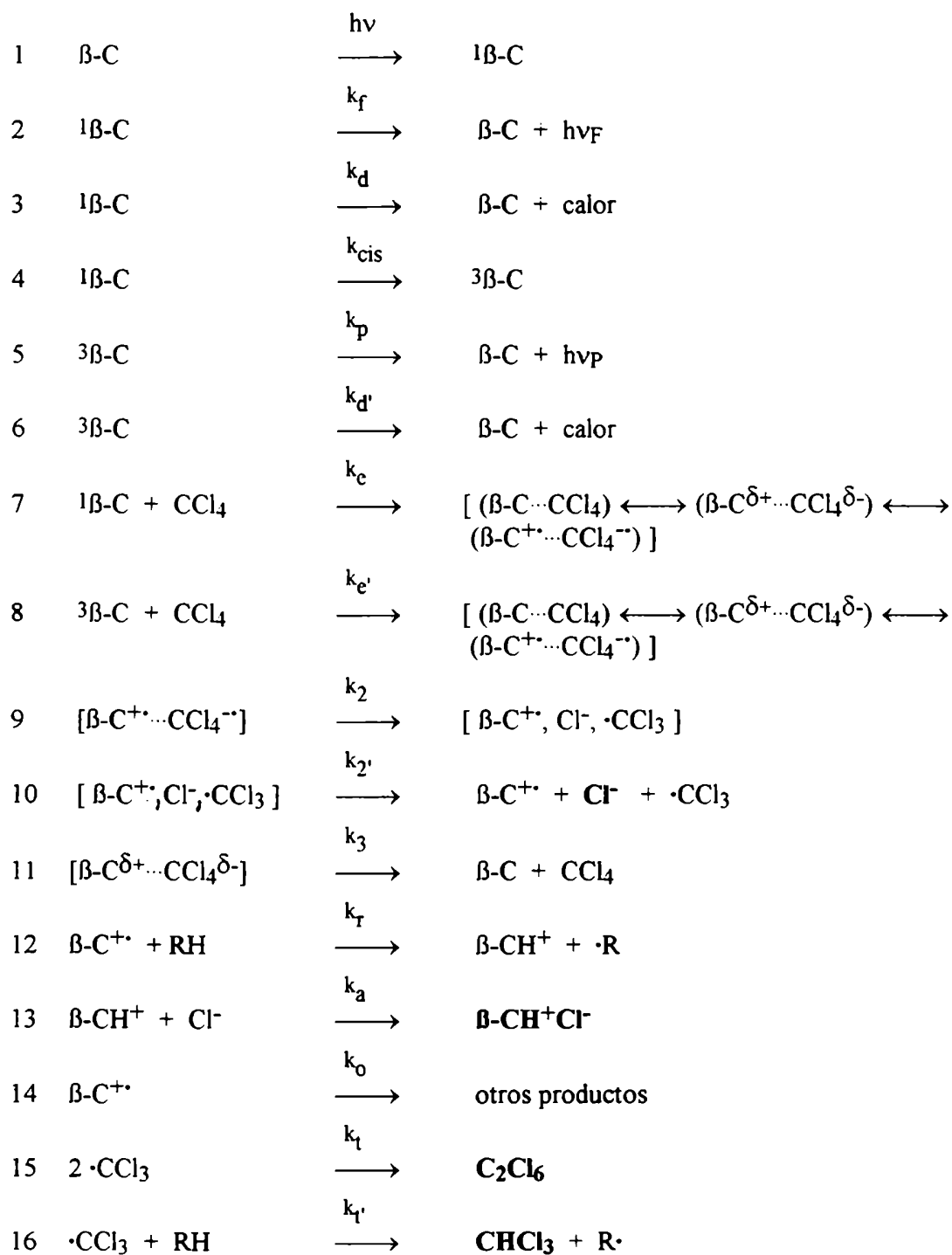
Figura 43 A**Figura 43 B**

Figura 43 $1/\Phi_B$ en función de $1/[Q]$. $Q = \text{CCl}_4$ **43 A** *nor*-Harmano ($6,0 \times 10^{-5} \text{ M}$) en EtOH (●) y en MeCN (○). **43 B** Harmano ($5,5 \times 10^{-5} \text{ M}$) en EtOH (●) y en MeCN (○). Irradiaciones en atmósfera de aire.

ESQUEMA 4

En ausencia de O₂

planteando estado estacionario para las especies intermedias, queda que:

$$\Phi_P = \frac{k_2 k_r [RH] [Q] (k_e + k_e' k_{cis} / (k_d' + k_p + k_e' [Q]))}{k_q (k_o + k_r [RH]) (k_d + k_f + k_{cis} + k_e [Q])} \quad [45]$$

donde $k_q = k_2 + k_3$ y $Q = CCl_4$

El rendimiento cuántico de la desaparición de reactivo Φ_B es igual a la sumatoria de los rendimientos cuánticos de formación de productos Φ_P . Como en este caso se forma un sólo producto que incluye a la unidad β -carbolina en su estructura con un rendimiento mayor al 95 %, el Φ_B resulta igual a Φ_P .

Entonces en el caso estudiado donde $[Q] \gg [RH]$, en atmósfera de N_2 , se puede considerar que la $[Q]$ permanece constante, con lo cual queda

$$\Phi_P = K_1 K_2 [RH] / (K_3 (k_r [RH] + k_o)) \quad [46]$$

donde:

$$K_1 = k_2 k_r [Q], K_2 = k_e + k_e' k_{cis} / (k_d' + k_p + k_e' [Q]), K_3 = k_q (k_d + k_f + k_{cis} + k_e [Q])$$

$$\text{por lo tanto } 1 / \Phi_P = 1 / \Phi_B = k_r K_3 / K_1 K_2 + (k_o K_3 / K_1 K_2) 1 / [RH], \quad [47]$$

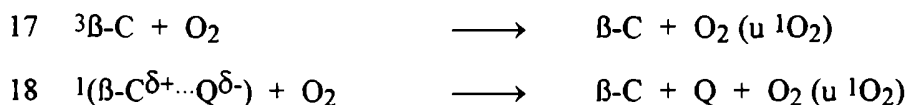
Es decir que según este esquema de reacción en condiciones experimentales de irradiación en ausencia de oxígeno y $[Q] \gg [RH]$ se esperarían obtener rectas al graficar $1/\Phi_B$ en función de $1/[RH]$. Como se ve en la Figura 42 éste es el tipo de gráfico obtenido en el caso del *nor*-harmano y harmano.

También se estudiaron los aspectos cinéticos de las reacciones cuando las mismas fueron realizadas en atmósfera abierta y $[RH] \gg [Q]$

Las experiencias previas de quenching de fluorescencia (Capítulo 3) mostraron que el oxígeno no desactiva en forma eficiente el S_1 , y de los datos cinéticos se sabía que la presencia del mismo modifica la velocidad de reacción. Esto se explicaría proponiendo que:

- a) en ausencia de oxígeno la reacción ocurriría también desde el estado triplete. Como es sabido los estados T_1 son desactivados eficientemente por el oxígeno, tratándose entonces simplemente de un quenching físico por el cual se regenera la materia prima. Cabe señalar que algunos autores^{106,107} han descrito la generación de 1O_2 a partir de β -carbolinas electrónicamente excitadas. Aún en caso que se genere esta especie, no se han detectado productos de reacción que pudieran provenir de la reacción del 1O_2 con las β -carbolinas.
- b) el oxígeno quenchearía eficientemente el exciplete formado compitiendo con el proceso que da origen al producto observado, favoreciendo la desactivación del exciplete vía la regeneración de la materia prima.

Entonces para las irradiaciones efectuadas en presencia de aire deben agregarse al Esquema 4 pasos donde se incluya la presencia de oxígeno:



Considerando que el paso [17] es mucho más eficiente que el paso [8], en presencia de oxígeno la reacción ocurre solamente desde el S_1 , con lo cual

$$\Phi_P = (k_r k_2 k_e [RH] [Q]) / (k_q (k_o + k_r [RH]) (k_d + k_e [Q])), \quad [48]$$

donde $k_q = k_2 + k_3$ y $Q = CCl_4$

y si $[RH] \gg [Q]$

$$\text{queda } 1 / \Phi_B = b k_q / k_2 + (b k_d / k_2) 1 / [Q], \quad [49]$$

donde $b = 1 + k_o / k_r [RH]$

entonces: ordenada al origen / pendiente = $k_q / k_d = K_{sv}$

Es decir que según este esquema de reacción cuando se trabaja en presencia de oxígeno y $[RH] \gg [Q]$, al graficar $1 / \Phi_B$ en función de $1/[Q]$ se esperaría obtener rectas.

Como se ve en la Figura 43 éste es el tipo de gráfico obtenido en el caso del *nor*-harmano y harmano usando como solventes etanol y acetonitrilo.

En la Tabla 37 se comparan los valores de Ksv obtenidos teniendo en cuenta este esquema de reacción (método cinético) con aquéllos obtenidos en los estudios de quenching de fluorescencia en estado estacionaria (ver Tabla 27, Capítulo 3).

Tabla 37 Valores de Ksv calculadas a partir de métodos cinéticos y estáticos^(a)

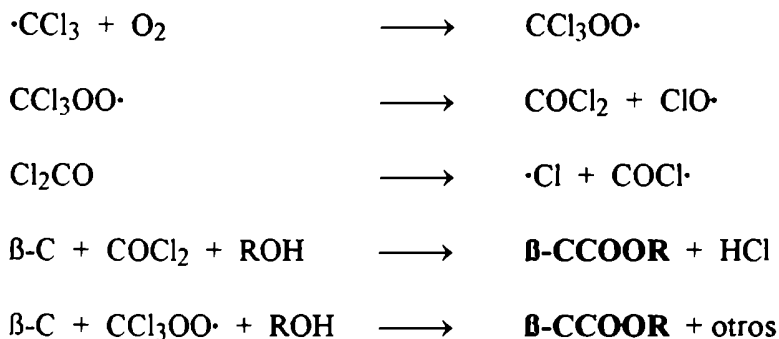
Solvente	<i>nor</i> -Harmano		Harmano	
	Cinético	Estático	Cinético	Estático
EtOH	5,4	15,3	2,8	11,2
MeCN	22,4	23,2	16,5	17,2

(a) Ksv en M⁻¹; quencher: CCl₄.

Los valores de Ksv obtenidos por ambos métodos cuando se utilizó acetonitrilo como solvente coinciden. Entonces se puede concluir que, en estas condiciones experimentales (atmósfera de aire) la reacción ocurre desde el estado excitado singulete.

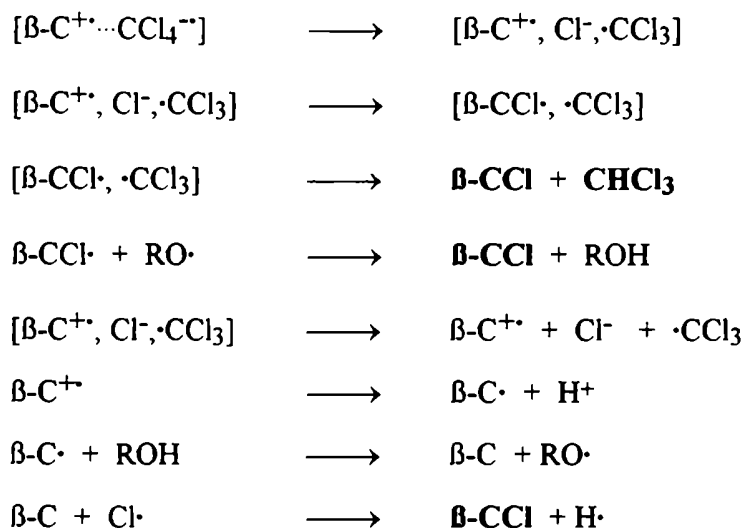
En el caso de usar como solvente etanol, si bien los valores de Ksv no llegan a diferir en un orden, no coinciden plenamente. Esto podría deberse a que como en este medio la β -carbolina está complejada con el ROH a través de un puente de hidrógeno (ver discusión en el Capítulo 1) se incrementa la proporción de procesos de desactivación no radiativos¹⁰⁸ con lo cual se ve afectado el valor de la relación k_q / k_d .

Teniendo en cuenta los subproductos caracterizados al efectuar las irradiaciones, en presencia de oxígeno también deben incluirse los siguientes pasos de reacción



Estos pasos son poco importantes ya que la cantidad de ésteres detectada en todos los casos fue muy baja (nivel de trazas).

La presencia de productos clorados, como ya se planteó antes, podría explicarse a partir de la formación del catión radical de la β -carbolina y posterior reacción de éste con el ion cloruro en la misma caja de solvente:



Estos pasos también son poco importantes ya que la cantidad de productos clorados detectados en todos los casos fue mínima.

4.4.2 Reacción fotoquímica en la presencia de atrapantes de radicales

Con el objeto de obtener información adicional acerca de la posible participación de radicales en las etapas de formación de los fotoproductos principales de la reacción se efectuaron experiencias irradiando las β -carbolinas en presencia de atrapantes de radicales.

Para ello se seleccionó como sistema modelo a la reacción fotoquímica del harmano (10^{-5}M) en la mezcla etanol- CCl_4 1:1 (v:v). Esta solución se irradió independientemente en presencia de dos atrapantes de radicales diferentes: ciclohexeno y galvinoxil, monitoreándose en ambos casos el consumo de la β -carbolina por espectroscopía de absorción UV-vis, según se describe en la Parte Experimental E.12.3.

Cuando se utilizó ciclohexeno en relación molar respecto del harmano 10:1 y 100:1 no se observó cambio alguno en la velocidad de la reacción, tal como se muestra en la Figura 44. Un resultado similar se había obtenido al irradiar el *nor*-harmano en CHCl_3 en presencia de ciclohexeno y naftaleno, según se describe en la Parte Experimental E.7.2.1.

Estos resultados indican que no se forma un radical muy reactivo en el seno de la solución durante la irradiación, ya que la reacción no es inhibida por el ciclohexeno.

Cuando se utilizó galvinoxil en relación molar 10:1 respecto del harmano, tanto en atmósfera abierta como bajo atmósfera de nitrógeno, la reacción se inhibió completamente. En el caso de utilizar dicho atrapante en relación molar 1:1 se observó primero un tiempo de inducción y luego una cierta conversión de la materia prima aunque más lenta tal como se puede ver en la Figura 45. Cuando se irradió en la mismas condiciones a la solución de galvinoxil sin β -carbolina no se observó cambio alguno. Cabe señalar que el galvinoxil presenta una señal a $\lambda_{\text{máx}}$ 430 nm y otra a 772 nm con lo cual se puede monitorear simultáneamente al galvinoxil y a la β -carbolina.

La no disminución de la absorbancia de la materia prima en presencia del galvinoxil podría explicarse teniendo en cuenta que por su estructura¹⁰⁹ (ver Figura 44) éste no sólo

tiene capacidad de atrapar radicales sino que por ser un compuesto quinoideo tiene capacidad de aceptar electrones. Es decir podría formarse un complejo en el estado excitado (exciplete) entre la β -carbolina y el galvinoxil. Si bien no se conoce el valor de su E_{red}^0 compuestos quinoideos de estructura similar al galvinoxil presentan los siguientes valores: (en V vs ECS)^{109b} 1,4-benzoquinona: -0,51, 9,10-antraquinona: -0,94, siendo estos valores de E_{red}^0 similares al del CCl₄: -0,78. Entonces haciendo uso de la ecuación de Rehm-Weller (ecuación [32]) surge que la transferencia de electrones sería un proceso termodinámicamente factible y en este caso un proceso reversible, razón por la cual no se consume la β -carbolina (monitoreo de la reacción: absorción UV-vis.). Este exciplete entre la β -carbolina y el galvinoxil competiría con la formación del exciplete entre la β -carbolina y el CCl₄. Como ya se discutió en este último la transferencia del electrón es irreversible con lo cual se produce finalmente la forma protonada del alcaloide, aunque a una marcada menor velocidad (Figura 45). La presencia de orbitales π vacantes en el galvinoxil explicaría la estabilidad del dirradical (o anión) formado en la caja del solvente y el carácter reversible de esta transferencia de electrones. La diferente estabilidad de los aniones radicales alifáticos y aromáticos se discute también en la sección 4.4.3.

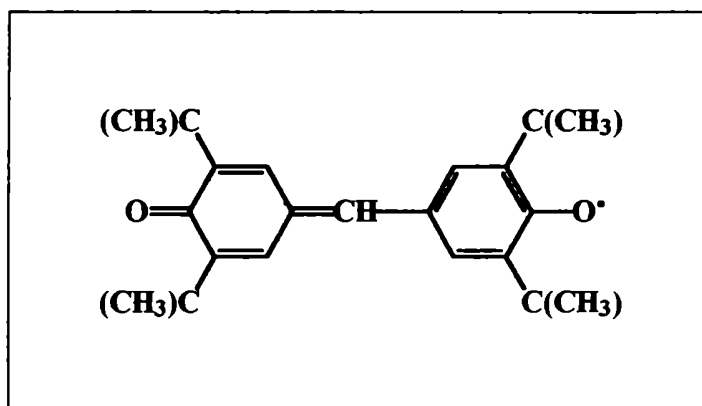


Figura 44 Estructura del galvinoxil.

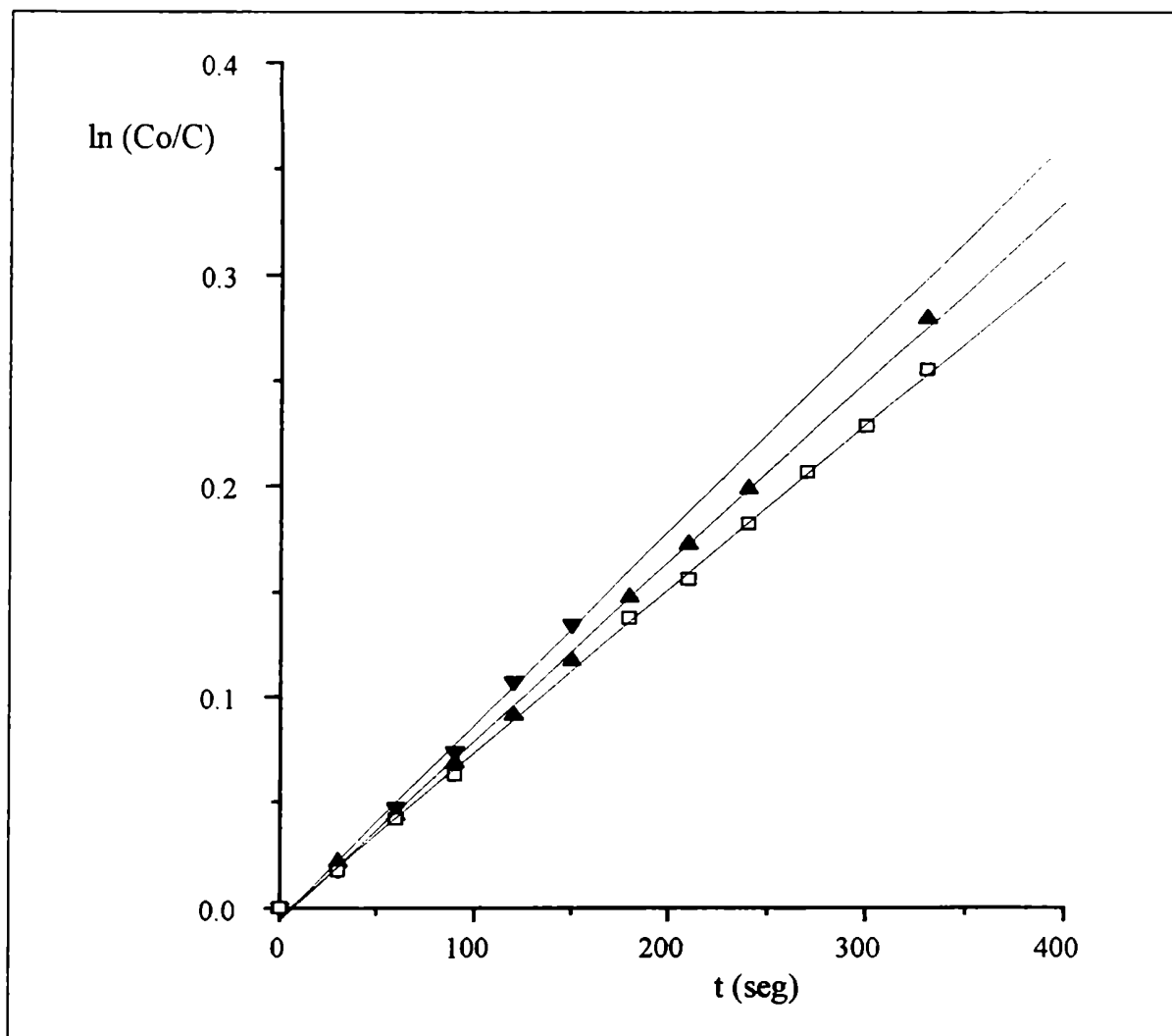


Figura 45 $\ln (C_o/C)$ en función del tiempo de irradiación del **harmano** (atmósfera de aire) en EtOH-CCl₄ 1:1 (v:v) ($C_o = 4,6 \times 10^{-5}$ M): (□) solución testigo; (▲) con ciclohexeno $5,0 \times 10^{-4}$ M; (▼) con ciclohexeno $3,2 \times 10^{-3}$ M.

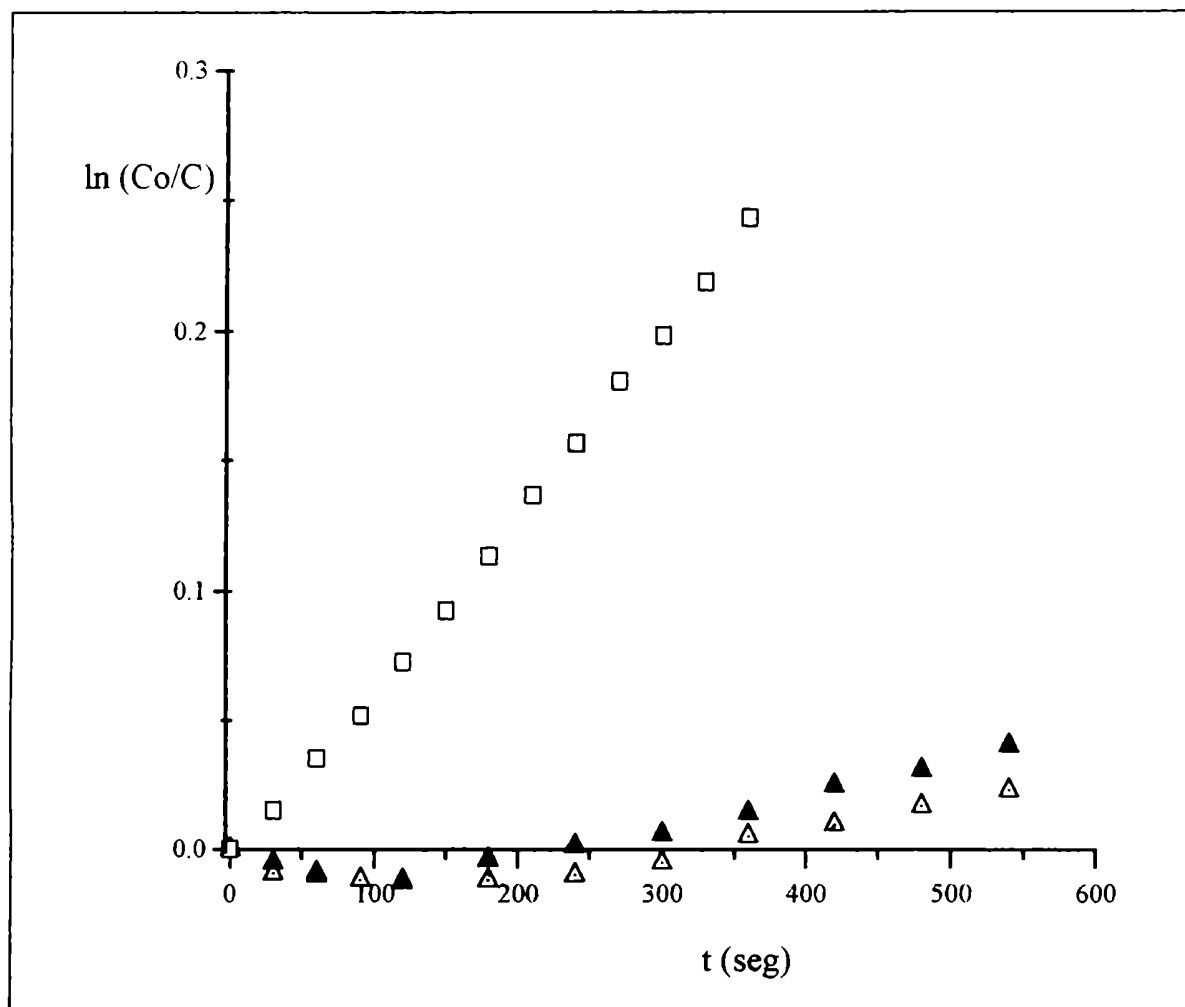
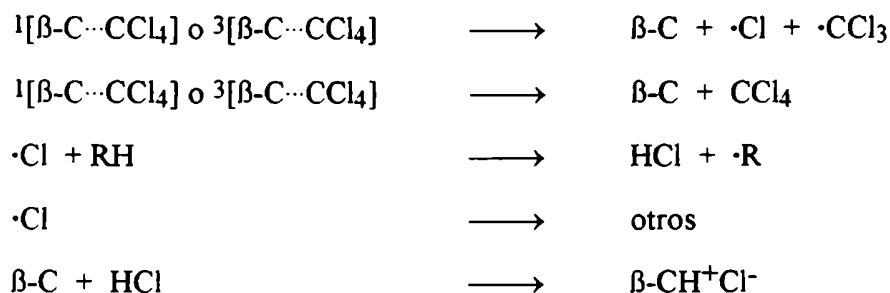


Figura 46 $\ln(Co/C)$ en función del tiempo de irradiación del **harmeno** en EtOH-CCl₄ 1:1 (v:v) ($Co = 4,5 \times 10^{-5}$ M) (□) solución testigo; (▲) con galvinoxil $3,0 \times 10^{-5}$ M en atmósfera de N_2 ; (Δ) con galvinoxil $3,0 \times 10^{-5}$ M en atmósfera de aire.

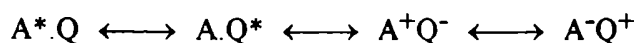
4.4.3 *Transferencia de electrón o transferencia de energía*

Podría ocurrir que las moléculas de β -carbolina electrónicamente excitadas en lugar de transferir un electrón (pasos 7 y 8 del Esquema 4), transfieran simplemente su energía como excitación vibracional a la molécula de CCl_4 que forma parte del exciplete, según se plantea en el Esquema 5.

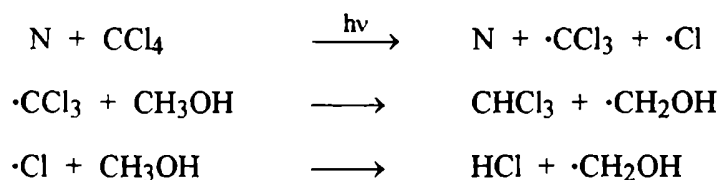
ESQUEMA 5: transferencia de energía



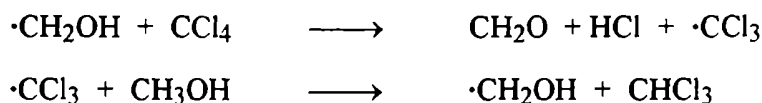
Esta cuestión es difícil de dilucidar. Por un lado la interacción con el CCl_4 no puede deberse a un clásico mecanismo de transferencia de energía electrónica (por un mecanismo de resonancia o de contacto molecular) ya que no existe un solapamiento real entre el espectro de emisión fluorescente del donador y el espectro de absorción del aceptor¹¹⁰. Sin embargo la energía del singulete de las β -carbolinas es de aproximadamente 75 kcal/mol y la energía de unión C-Cl es de 68 kcal/mol¹¹⁰, por lo tanto la transferencia de energía por otro tipo de mecanismo seguida de la ruptura homolítica de la unión C-Cl es energéticamente posible. Esta interacción podría deberse a la formación de un complejo en el estado electrónico excitado, donde la energía de unión provendría de interacciones del tipo "exciton" y transferencia de carga, en forma similar a la postulada por Hammond y col.¹¹⁰ para explicar el quenching de la emisión fluorescente de distintos hidrocarburos aromáticos por la presencia de norbornadieno y cuadriciclano.



Schulte-Frohlinde y col.¹¹¹ al estudiar la descomposición del CCl_4 fotosensibilizada por naftaleno (N) en solución metanólica, propusieron que podría tratarse de un proceso radicalario en cadena. La iniciación estaría dada por un proceso de transferencia de carga (*sic*) durante el quenching de la molécula aromática excitada por la molécula de CCl_4 , dando así origen a los radicales $\cdot\text{CCl}_3$ y $\cdot\text{Cl}$ según:



La propagación ocurriría según:



y la terminación estaría dada por la reacción entre dos radicales.

Cuando agregaron oxígeno a la mezcla de reacción no observaron la reacción en cadena. En este trabajo los autores propusieron que la producción de HCl se debería a una reacción radicalaria en cadena en la que se produce una abstracción de H por parte de un átomo de Cl. Sin embargo no obtuvieron evidencia directa ni de la producción del $\cdot\text{Cl}$ ni tampoco identificaron el estado electrónico excitado del naftaleno responsable de la fotosensibilización.

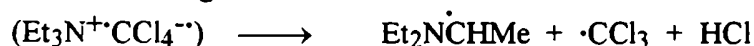
Gannon y McGimpsey¹¹² utilizando la técnica de flash fotólisis con dos láseres secuenciados fueron capaces de caracterizar los fotoproductos primarios transientes formados durante la irradiación del 2-acetilnaftaleno (ATN) en mezclas de CCl_4 -metanol. Así determinaron que la reacción ocurre desde el primer estado electrónico excitado triplete del ATN, ya que pudieron caracterizar al estado T_1 observando la absorción T-T y determinar que este estado es desactivado por el CCl_4 . Como el CCl_4 es capaz de desactivar estados excitados ya sea como aceptor de electrones o de energía o actuando como átomo

pesado favoreciendo cruce intersistemas, investigaron la presencia de átomos de Cl ya que esto sería una buena evidencia de que el proceso involucrado es el de transferencia de energía. Para ello lograron detectar la señal de un complejo π transiente formado entre el radical $\cdot\text{Cl}$ y el benceno. En este caso el rendimiento cuántico de formación del HCl es mucho menor que en el caso descrito por Schulte-Frohlinde¹¹¹. Esto, en opinión de los autores¹¹², podría deberse a una terminación de cadena muy eficiente debido a las altas concentraciones locales de radicales producidas normalmente por fuentes láseres de alta fluencia.

Para la formación de HCl en cualquiera de los dos solventes utilizados en las experiencias antes descritas (etanol o acetonitrilo) es necesaria la presencia de una molécula capaz de ceder un hidrógeno. Esta molécula sería la del cosolvente, actuando como tal incluso el acetonitrilo. Este no es un hecho improbable ya que se ha detectado la presencia del radical $\cdot\text{CH}_2\text{CN}$ al irradiar peróxido de ter-butilo en acetonitrilo en presencia de CCl_4 ¹¹³.

Por otro lado la transferencia de un electrón desde una molécula de β -carbolina electrónicamente excitada a una molécula de CCl_4 es un proceso termodinámicamente factible (ver valores de ΔG en la Tabla 29, Capítulo 3).

En la literatura existen muchos ejemplos de procesos de transferencia electrónica entre aminas y CCl_4 . Kosower⁷⁷ propuso que el paso inicial de la reacción fotoquímica de la trietilamina con el CCl_4 es la formación de un CTC, el cual cuando es excitado reacciona para formar un par radical iónico formado por el catión radical de la amina y el anión radical del CCl_4 ($\text{CCl}_4^{\cdot-}$). Este radical aniónico no es detectado como tal dado que se descompondría rápidamente generando el radical $\cdot\text{CCl}_3$ y el ion Cl^- . Este a su vez abstraería un H^+ de la amina según:



Markarian y H. Fischer¹¹⁴ encontraron evidencias de estos pasos a través de estudios por CIDNP (RMN-¹H) de la fotólisis del sistema trietilamina-CCl₄ en soluciones de metanol deuterado y de acetonitrilo. Los efectos observados en el CIDNP y los parámetros g medidos para los radicales libres detectados se explican proponiendo la existencia del par radical geminal (Et₂N·CHMe·CCl₃) que se desproporcionaría a Et₂NCH=CH₂ + CHCl₃. Esto implica que el par radical iónico (Et₃N⁺·CCl₄⁻) se transforma al par radical neutro con formación de HCl en unos pocos ns. Esto está de acuerdo con el corto tiempo de vida medio del CCl₄⁻. También obtuvieron evidencias experimentales de la formación del clorhidrato de la amina.

Otro ejemplo es el estudiado por J.M. Saveant y col.¹¹⁵ quienes describieron la oxidación del 10-metil acridan a 10-metil acridinio. Esta oxidación ocurre cuando el 10-metil acridan electrónicamente excitado le transfiere un electrón al CCl₄ dando lugar a la formación del correspondiente catión radical, siendo posible medir el espectro de absorción del mismo por medio de experiencias de láser flash fotólisis. El anión radical, si es que se forma, se disocia instantánea e irreversiblemente para dar lugar a la formación del radical ·CCl₃ y el ion Cl⁻. El radical ·CCl₃ a su vez reacciona con el O₂ para dar CCl₃OO·, el cual oxida al radical del 10-metil acridan, formado a partir de la desprotonación del catión radical, para dar el producto final, el ion 10-metil acridinio.

Otro punto de discusión: ¿se forma el anión radical del CCl₄ o la transferencia de electrón es simultánea con la ruptura de la unión? En el caso de halogenuros de alquilo alifáticos el proceso de transferencia electrónica y ruptura de la unión es simultáneo e irreversible mientras que en el caso de halogenuros de arilmetilo se tienen evidencias de la formación del anión radical¹¹⁶. La presencia de orbitales π vacantes que alojan al electrón en los halogenuros aromáticos explicaría la mayor estabilidad de estos aniones radicales. Para metanos polihalogenados la estabilidad de los mismos está aun en discusión¹¹⁷.

Por el momento no podemos dilucidar si la desactivación de la β-carbolina electrónicamente excitada por acción del CCl₄ se trata de una transferencia de energía o de

una transferencia de un electrón, formándose el catión radical de la β -carbolina. Esta especie aun no ha sido descripta. Nosotros no contamos aun con los medios necesarios para caracterizarla. Probablemente este catión radical tenga un tiempo de vida medio corto (del orden de los ns) y, de formarse, reaccione rápidamente.

Un hecho que induce a pensar que se forma principalmente el catión radical es el comportamiento del sistema frente a los atrapantes de radicales. Si ocurriera sólo un proceso de transferencia de energía se formaría con alta eficiencia el radical $\cdot\text{Cl}$. Este radical ha sido descripto como muy reactivo en la abstracción de átomos de H de hidrocarburos, teniendo la presencia del oxígeno debido al no degasado del solvente poco efecto en el rendimiento de la reacción¹¹⁶. Si hubiera una alta concentración de radical Cl en el medio debería observarse algún cambio cuando se agregó ciclohexeno, cosa que no ocurrió y también se esperaría obtener derivados del harmano y la harmina clorados en el grupo metilo del C-1.

Pero por otro lado la β -carbolina protonada sensibiliza la descomposición del CCl_4 en etanol ($\Phi_B = 0,10$, determinado según se describe en la Parte Experimental E.12.1). Este proceso no puede deberse a una transferencia de electrón. Por lo que a partir de la forma protonada la descomposición del CCl_4 debe ocurrir vía una transferencia de energía.

Para dilucidar estas cuestión habría que hacer experiencias de flash fotólisis y espectroscopía electrónica resuelta en el tiempo, para por un lado tratar de caracterizar al radical Cl a través de la detección del complejo π transiente que forma con el benceno en forma similar a la realizada por Gannon y McGimpsey¹¹² y por el otro tratar de caracterizar el catión radical a través de su espectro de absorción.

Tampoco puede descartarse que estos dos mecanismos operen independientemente de acuerdo a la forma en que se encuentre la β -carbolina. El mecanismo de transferencia electrónica operaría desde el estado excitado S_1 de la forma neutra mientras que el mecanismo de transferencia de energía (vía "exciton") sería el que operaría desde el estado excitado T_1 de la forma neutra y desde la forma protonada (catiónica).

4.4.4 Influencia del solvente en la reacción fotoquímica en presencia de CCl_4

Con el objeto de analizar que propiedad o propiedades del cosolvente influyen en la reacción fotoquímica estudiada decidimos medir Φ_B en distintas mezclas RH- CCl_4 1:1 (v:v). Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 38.

También determinamos el rendimiento cuántico de quenching Φ_Q para la concentración de CCl_4 (quencher) utilizada. El Φ_Q se define como la fracción de moléculas excitadas que son desactivadas a esa concentración de quencher. En las condiciones en las que se realizaron los espectros de emisión la I es proporcional a la concentración de sustrato con lo cual $\Phi_Q = (I_0 - I) / I_0 = 1 - I / I_0$

$$\Phi_Q = 1 - 1 / (1 + K_{sv} [Q]) \quad [50]$$

Tabla 38 Rendimientos cuánticos de desaparición de reactivo y de quenching de β -carbolinas en soluciones de RH : CCl_4 1:1 (v:v) ($[\text{CCl}_4] = 5,18 \text{ M}$).

β -Carbolina	RH	$\Phi_B^{(a)}$	$\Phi_Q^{(b)}$	$K_{sv}^{(c)}$
Harmano	EtOH	0,20	0,98	11,2
	MeOH	0,03	0,98	11,2
	n-PrOH	0,19	0,98	11,2
	MeCN	0,06	0,99	15,2
	Dioxano	0,12	0,99	15,2
	(Et) ₂ O	0,06	0,99	15,2
	CH_2Cl_2	0,02	0,99	15,2
nor-Harmano	EtOH	0,36	0,99	15,3
	MeOH	0,08	0,99	15,3

	Dioxano	0,09	0,99	23,2
	CH ₂ Cl ₂	0,05	0,99	23,2
Harmina	EtOH	0,17	0,99	20,0

(a) Valores obtenidos según lo descrito en la Parte Experimental E.12.2; (b) λ_{exc} 336 nm; (c) Valores de Ksv: se tomaron los valores de etanol para todos los alcoholes y los de acetonitrilo para los otros solventes.

Los Φ_Q reflejan una alta eficiencia de este proceso para las concentraciones de Q utilizadas (5,18 M). Esto también se desprende de comparar los valores de k de desactivación de las β -carbolinas excitadas: $k_F \cong 3 \times 10^8 \text{ s}^{-1}$ mientras que $k_q[Q] = 3 \times 10^9 \times 5,18 \text{ s}^{-1} \text{ M} = 15 \times 10^9 \text{ s}^{-1} \text{ M}$.

Tabla 39 Eficiencias cuánticas de desaparición de **harmano** en soluciones de RH : CCl₄ 1:1 (v:v) y algunas propiedades de RH

RH	Φ_B (a)	ΔH_f del radical(b) (kcal / mol)	α (c)	β (d)	π^* (e)	$E_T(30)$ (f)
i-PrOH	> 0,20	-26,6	0,76	0,84	0,48	49,2
EtOH	0,20	-15,2	0,86	0,75	0,54	51,9
n-PrOH	0,19		0,84	0,90	0,52	50,7
Dioxano	0,12		0,00	0,37	0,55	36,0
MeCN	0,06	58,2	0,19	0,40	0,75	45,6
(Et) ₂ O	0,06	-20,2	0,00	0,47	0,27	34,5
MeOH	0,03	-2,2	0,98	0,66	0,60	55,4

CH ₂ Cl ₂	0,02		0,13	0,10	0,82	32,4
ciclohexano	0	13,9	0,00	0,00	0,00	30,9

(a) medido según lo descrito en la Parte Experimental E.12.1 y E.12.2; (b) de la referencia 63; (c) parámetro α de Taft⁵²; (d) parámetro β de Taft⁵²; (e) parámetro π^* de Taft⁵²; (f) parámetro de polaridad de solvente de Reichardt⁶².

Como se ve en la Tabla 39 los valores de Φ_B no siguen una tendencia clara respecto a algún parámetro de polaridad de solvente. Cabe señalar cuando se usa como RH al 2-propanol, la reacción ocurre instantáneamente, de tal forma que no se la pudo comparar con los otros solventes. En principio en la condiciones de reacción (RH-CCl₄ 1:1), considerando que tanto el CCl₄ como el RH se encuentran en exceso respecto del reactivo, se esperaría que los datos correlacionen con alguna propiedad que refleje la capacidad donora de hidrógeno del RH. Sin embargo no es este el caso. Por ejemplo, el metanol, cuyo valor de α es el más alto, tiene una reactividad similar a la de otros solventes con α menor. En una propiedad que se destaca el 2-propanol es en el valor de la entalpía de formación (ΔH_f) del radical. Como se ve en la Tabla 39 este proceso es el más exotérmico. Esta propiedad correlaciona con el orden de reactividad observado para RH = ROH. Si el valor del ΔH_f para el radical dioxinilo fuera similar al del otro éter, el éter etílico, se explicaría la alta reactividad observada en dioxano. Considerando que el valor de ΔH_f para ciclohexano es positivo, explicaría porque la reacción no ocurre en este solvente. Sin embargo esto no ocurre al usar acetonitrilo, donde también la ΔH_f es positiva, o CH₂Cl₂ transcurriendo en ambos solventes la reacción con un Φ_B igual al de otro solventes con ΔH_f negativa. Tal vez en estos casos el mecanismo operante sea distinto y los factores que gobiernan el paso limitante de la reacción sean diferentes.

Conclusiones

Hemos visto a lo largo de este Capítulo que las β -carbolinas aromáticas en solución, disueltas en mezclas RH-CCl₄ (RH = etanol, 2-propanol, acetonitrilo) reaccionan por interacción con radiación UV para dar el correspondiente clorhidrato con un rendimiento mayor del 98 %. El mismo producto se forma al irradiarlas en soluciones de CHCl₃ o CH₂Cl₂ donde no es necesario agregar una especie donora de hidrógeno (RH).

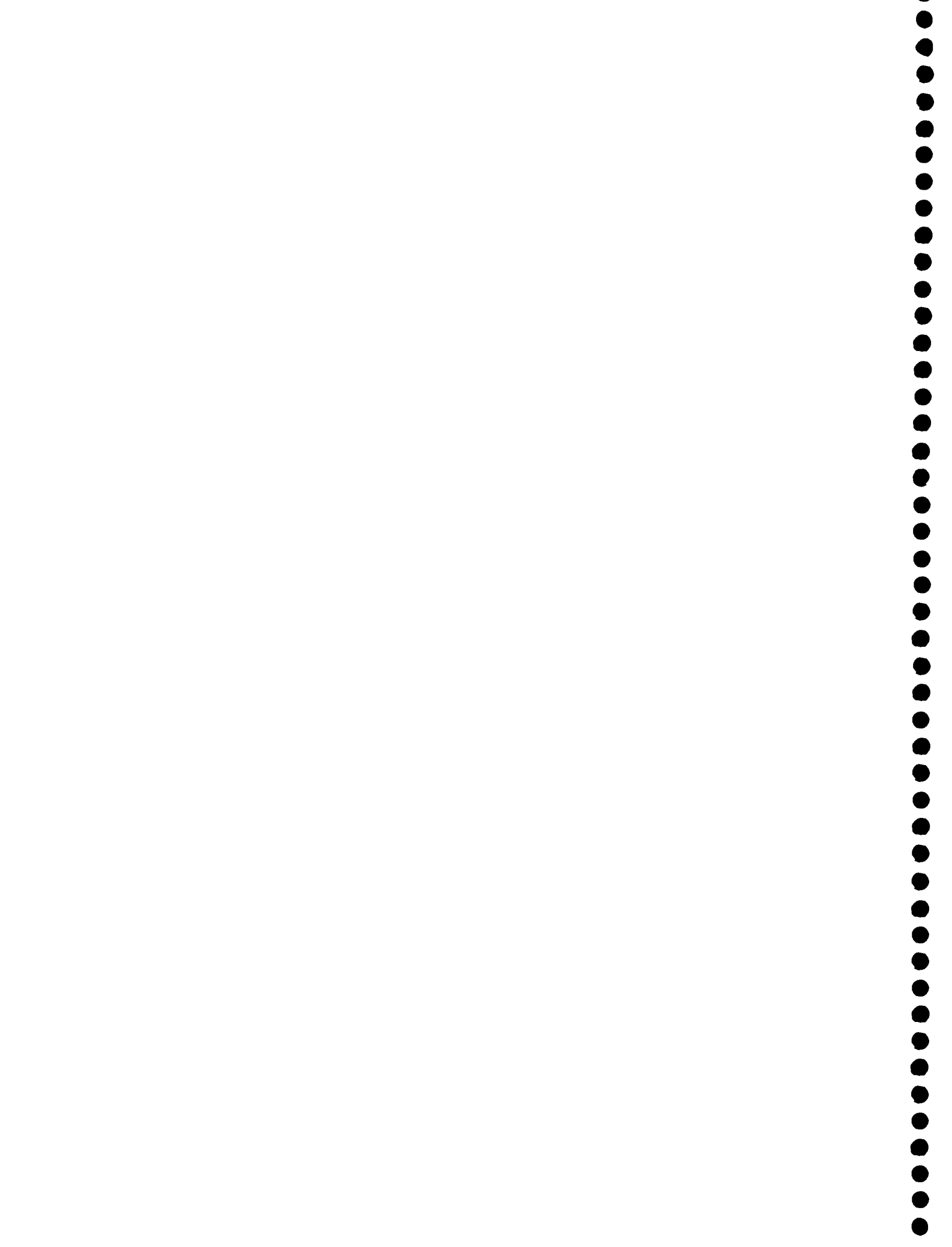
La interacción entre la β -carbolina electrónicamente excitada con la molécula de CCl₄ sería el primer paso de la reacción. Como consecuencia de ésta se forma el radical $\cdot\text{CCl}_3$ evidenciado por la formación de productos tales como CHCl₃ y C₂Cl₆. En esta primera interacción podría ocurrir una transferencia de energía o una transferencia de electrón. Tal como lo hemos señalado en este momento no tenemos evidencias suficientes a favor de alguno de los dos procesos si bien el segundo parece ser el más lógico. De ocurrir una transferencia de electrón, proceso termodinámicamente factible, se formaría el catión radical de la β -carbolina, el cual reaccionaría con el solvente abstrayendo un hidrógeno para dar el producto principal de la reacción: el catión, es decir la forma protonada de la β -carbolina. En el caso de la transferencia de energía se formaría el radical $\cdot\text{Cl}$ el cual abstraería un H del medio para formar primero el HCl, el que por medio de una simple reacción ácido-base con la β -carbolina da origen al clorhidrato correspondiente. Los estudios fotofísicos (Capítulo 3) y la falta de sensibilidad de la reacción a la presencia de un atrapante de radicales como el ciclohexeno avalarían la hipótesis de que el mecanismo predominante es la transferencia del electrón desde la β -carbolina neutra electrónicamente excitada.

También hemos descripto que el efecto de la ausencia de oxígeno no influye en la naturaleza de los productos principales sino en la eficiencia con que se forman, pudiendo explicarse este efecto debido simplemente a un quenching físico.

La naturaleza del cosolvente tampoco influye en la naturaleza del producto principal aunque sí en la velocidad del proceso, lo que puede explicarse combinando propiedades

tales como su capacidad para formar puentes de hidrógeno, generar radicales por pérdida de hidrógeno y su tamaño molecular.

Entre los subproductos se encontraron trazas de carboalcoxi ésteres y β -carbolinas monocloradas. Los primeros provendrían de la interacción de la β -carbolina con los reactivos acilantes ($\text{CCl}_3\text{OO}\cdot$ y/o el fosgeno, formados por reacción del radical $\cdot\text{CCl}_3$ con el oxígeno) y el alcohol. Los derivados clorados a su vez provendrían de la interacción del catión radical de la β -carbolina con el ion Cl^- dentro de la caja de solvente o bien de la interacción de la β -carbolina neutra en su estado fundamental con el radical $\cdot\text{Cl}$, formado a partir de la descomposición del fosgeno y/o del radical $\cdot\text{CCl}_3$. El último sería el mecanismo de reacción más probable ya que se observó un aumento en el rendimiento y cantidad de productos clorados cuando la irradiación se realizó en presencia de oxígeno. Debe recordarse que estos productos se detectaron en cantidad de trazas, siendo muy dificultosa su caracterización e identificación.



PARTE EXPERIMENTAL



E.1 β -carbolinas

Los alcaloides utilizados fueron adquiridos a Fluka y Aldrich. La pureza de los mismos fue controlada por ccd, punto de fusión y, en algunos casos, por EM.

El harmalol fue usado como base libre, preparada a partir del correspondiente clorhidrato comercial. A una solución acuosa del mismo se le agregó carbonato de sodio hasta lograr mantener su alcalinidad. El sólido obtenido por enfriamiento de dicha solución se filtró y fue usado i) sin otro tratamiento o ii) recrystalizado de agua siendo finalmente en ambos casos convenientemente secado.

Las soluciones fueron preparadas en la oscuridad y usadas inmediatamente. Siempre que fue posible se utilizaron recipientes de vidrio color caramelo.

E.2 Solventes

Los solventes utilizados fueron: hexano, CCl_4 y i-PrOH: Mallinckrodt A.R.; CH_2Cl_2 , EtOH absoluto, MeOH anhidro: Merck A.R.; t-BuOH, etilenglicol (EG): Carlo Erba A.R.; MeCN, ciclohexano, isopentano, n-BuOH: J.T. Baker grado para HPLC. Estos solventes fueron usados sin tratar o bien, cuando se indica expresamente, fueron secados y/o destilados.

Para eliminar trazas de ácidos y agua, siguiendo el método descrito por Reichardt⁶², el MeOH, el EtOH, el i-PrOH y el t-BuOH fueron filtrados a través de una columna de cromatografía rellena de alúmina básica (M. Woelm-Eschwege, actividad I) (solvente AB). En algunos casos estos solventes fueron destilados y recogidos sobre tamices moleculares de 4 Å (solvente TM) o simplemente secados (Na_2SO_4 o K_2CO_3) y destilados (solvente SD).

El MeOH anhidro fue obtenido tratando 5 ml del mismo con 0,5 g de virutas de Mg y 0,05g de I_2 bisublimado, calentando la mezcla a reflujo hasta desaparición del I_2 y del Mg, el

cual queda como $\text{Mg}(\text{MeO})_2$. A continuación se agregaron 100 ml de MeOH y luego de 2 hs de calentamiento de la mezcla a reflujo bajo atmósfera de N_2 , se destiló y recogió sobre tamices moleculares de 4 Å¹¹⁹.

El CHCl_3 fue purificado con la siguiente metodología: una porción fue tratada 3 veces con un pequeño volumen de H_2SO_4 concentrado (5% del volumen total a tratar, aproximadamente), lavada con agua hasta reacción neutra del tornasol, secada sobre CaCl_2 o K_2CO_3 , destilada y guardada en la oscuridad sobre tamices moleculares de 4 Å¹²⁰.

El uso de solventes tratados de una u otra forma modifica los espectros de absorción y/o emisión de algunas de las β -carbolinas estudiadas. Estos resultados se presentan y se discuten en el Capítulo 2.

Fue utilizada agua de baja conductividad (MilliQ).

Soluciones con distintos pH fueron preparadas por agregado de soluciones de H_2SO_4 A.R., HClO_4 A.R. e KOH A.R. al solvente correspondiente.

E.3 Equipos utilizados:

- Espectrofotómetros Hewlett Packard 8451A y 8452A con detector de arreglo de diodos (190 a 820 nm).
- Espectrómetro de luminiscencia Perkin Elmer LS-5.
- Cromatógrafo gaseoso Hewlett Packard 5890A serie 1.
- Cromatógrafo gaseoso-espectrómetro de masa Trio-2 VG.
- Espectrómetro de masa Varian MAT CH7 A, acoplado a una computadora Varian MAT Data-System.
- Espectrómetro de RMN Varian XL-100-15.
- Aparato de punto de fusión Kofler provisto de microscopio, p.f. sin corregir.

E.4 Espectros electrónicos

Los espectros electrónicos de absorción ultravioleta-visible (UV-vis) se realizaron a temperatura ambiente en un espectrofotómetro Hewlett Packard 8451A con detector de arreglo de diodos (190 a 820 nm), usando un filtro de corte a 265 nm. En los casos en que se controló la temperatura, se utilizó el accesorio portacubetas termostatzado.

Los espectros de luminiscencia (emisión y excitación fluorescentes y fosforescentes) se realizaron en un espectrómetro de luminiscencia Perkin Elmer LS-5, cuya señales son corregidas en forma automática respecto de la variación de la potencia de la lámpara con la longitud de onda mediante un contador cuántico de Rodamina B. En algunos casos se hicieron las experiencias bajo atmósfera de N₂, saturando la solución con este gas. Cuando fue necesario, éste fue equipado con los accesorios correspondientes para hacer mediciones de fosforescencia y de luminiscencia frontal. Los espectros a 77 K fueron registrados en matrices transparentes producidas al enfriar con nitrógeno líquido una solución de etanol contenida en una cuba redonda de 2 mm de diámetro interno. Los espectros de la muestra en estado sólido como polvo y en fase adsorbida fijada sobre distintos soportes fueron realizados usando el accesorio de luminiscencia frontal. Los soportes utilizados fueron: i) placas de sílica gel Merck tratadas previamente de la siguiente forma: primero eluidas con MeOH, luego irradiadas con una lámpara de Hg Desaga UV 131000, provista de un filtro de interferencia a 366 nm durante 10 minutos, a continuación calentadas en estufa a 110°C durante 10 minutos y finalmente sembrada la muestra y eluida con AcOEt:EtOH 10:1 y ii) papel Whatman n° 41.

Los espectros corregidos (respecto del sistema óptico del monocromador de emisión) fueron registrados usando una computadora AT286 interfaseada al espectrómetro de luminiscencia Perkin Elmer LS-5, haciendo uso de un programa elaborado por C.

Colombano, G. Meda y L. Slep que corregía la señal luminiscente con el factor de corrección correspondiente a cada valor de longitud de onda.

Cuando se estudió el efecto de la concentración en los espectros electrónicos se prepararon soluciones cuyas concentraciones variaron entre 5×10^{-3} M y 10^{-6} M diluyendo convenientemente la solución más concentrada, empleando con fines comparativos celdas de diferente paso óptico.

E.4.1 *Determinación de la K de asociación entre β -carbolinas y ROH*

A una solución de β -carbolina disuelta en ciclohexano o isopentano de concentración aproximada 10^{-5} M, se le agregaban porciones crecientes de ROH, en volúmenes pequeños (Vag), 1 a 30 μ l siendo el volumen total usado (Vt), 3,0 ml. En cada experiencia se determinó la concentración exacta de β -carbolina por espectrometría UV-vis usando el ϵ correspondiente al solvente hidrocarbonado. También se determinó la concentración de ROH en el medio según la ecuación: $[ROH] = [ROH]_0 \text{ Vag} / Vt$. Los valores de la constante de asociación así obtenidos se discuten en el Capítulo 1.

E.4.2 *Determinación de la Ka en MeCN*

La técnica utilizada para la determinación de Ka se detalla en el Capítulo 2. Aquí se describen sólo el titulante utilizado.

Preparación de la solución de $HClO_4$ 0,1 M en ácido acético¹²¹: Se preparó diluyendo 4,2 ml de $HClO_4$ 70% en 500 ml de AcOH glacial con el agregado de 5 ml de anhídrido acético. El título de la misma fue determinado con biftalato de potasio usando como indicador violeta de cristal 1% en AcOH glacial (cambio de color: violeta a amarillo).

E.5.1 Medición del apagamiento (quenching) de la fluorescencia

Se registraron los espectros de emisión fluorescente, a temperatura ambiente, de soluciones de las β -carbolinas en el solvente adecuado a las cuales se le agregaban cantidades crecientes del quencher o se preparaban soluciones con la concentración apropiada de quencher, manteniendo siempre la concentración de alcaloide constante, alrededor de 10^{-5} M. Se tomaron los valores de intensidad de los máximos de fluorescencia ya sea de espectros tanto corregidos como de éstos sin corregir, obteniéndose valores similares en ambos casos. Se realizaron mediciones en atmósfera de aire y algunas bajo atmósfera de N_2 , saturando con este gas la solución a medir. A partir de estos datos, se pudieron calcular los valores de K_{sv} los que se muestran y discuten en el Capítulo 3.

Los solventes utilizados fueron: EtOH, i-PrOH y MeCN

Los quenchers utilizados fueron (rango de concentración): CH_2Cl_2 (0,1 a 0,7 M), $CHCl_3$ (5×10^{-3} a 2×10^{-2} M), CCl_4 (5×10^{-3} a 2×10^{-2} M), CH_2Br_2 (5×10^{-3} a 2×10^{-2} M), CH_2BrCH_2Br (5×10^{-3} a 2×10^{-2} M), $CHBr_3$ (5×10^{-3} a 2×10^{-2} M) y CBr_4 (5×10^{-5} a 5×10^{-4} M).

E.5.2 Medición de los rendimientos cuánticos de fluorescencia Φ_f

Para poder calcular el Φ_f de la muestra, se requiere la previa corrección de los espectros de emisión fluorescente de la sustancia usada como referencia y de la muestra en estudio. Al efectuar las mediciones en el mismo equipo los rendimientos cuánticos de la muestra y la referencia se relacionan según¹²²:

$$\Phi_{fm} = [(A_r F_m n^2) / (A_m F_r n_o^2)] \Phi_{fr}$$

donde el subíndice r se refiere a la referencia, el m se refiere a la muestra, Φ_f es el rendimiento cuántico de fluorescencia, A es la absorbancia a la longitud de onda de excitación, F es el área del espectro de emisión fluorescente y n es el índice de refracción del solvente que contiene a la muestra y n_0 el del que contiene a la referencia a la temperatura de la medición¹²⁰.

La absorbancias de la muestra y de la referencia fueron igualadas a la longitud de onda seleccionada para la excitación a valores menores de 0,02 para que la intensidad de emisión fluorescente fuera directamente proporcional a la concentración de fluoróforo, minimizando así los efectos de reabsorción y reemisión. Las áreas de los espectros de emisión fueron obtenidas al sumar la intensidad de emisión a cada longitud de onda en el rango elegido usando un apéndice del programa diseñado para tomar los espectros en forma digitalizada o bien con el programa Excel 4.0. La corrección debida al índice de refracción se realizó para minimizar el efecto de cambio de intensidad de la luz debido a la refracción y a la reflexiones internas dentro de la celda.

En el caso de las β -carbolinas resultó ser una referencia adecuada una solución de 2-aminopiridina (concentración aproximada 10^{-5} M) en ácido sulfúrico 0,1 N¹²³.

Los Φ_f medidos se muestran y discuten en el Capítulo 1.

E.5.3 Medición de los tiempos de vida de emisión fluorescente

La medición de los tiempos de vida media de emisión fluorescente fueron realizados usando un fluorómetro con resolución temporal. Como fuente de excitación se utilizó un láser de N_2 ($\lambda = 337$ nm) de un ancho de pulso de 4 nm y como referencia, una solución de ludox. Se utilizaron un filtro de corte de 378 nm en la ranura de emisión y un filtro de banda de 318-392 nm, máximo a 360 nm, en la ranura de excitación. Los datos fueron recogidos por un osciloscopio digital Hewlett Packard 54504A y luego procesados en una

computadora usando un programa de deconvolución adecuado para tal fin. Se utilizaron soluciones de *nor*-harmano, harmano y harmina aproximadamente 10^{-5} M, usando como EtOH, *t*-BuOH y CH_2Cl_2 , en atmósfera abierta. Los valores obtenidos se muestran en el Capítulo 3

Estas mediciones se realizaron en el laboratorio del Dr. C. Previtali, durante la asistencia al curso de Cinética Fotoquímica dictado en la Universidad de Río Cuarto.

E.6 Determinación de los potenciales de oxidación de las β -carbolinas aromáticas

Todas las determinaciones electroquímicas fueron realizadas en MeCN (MeCN, J.T. Baker grado para HPLC) usando perclorato de tetraetilamonio (TEAP, 0,1 M, Fluka, grado polarográfico) como electrolito soporte, bajo atmósfera de Ar. La celda utilizada fue una de diseño convencional. Los potenciales fueron determinados por voltametría cíclica, siendo la velocidad de barrido 300 mV/s. El electrodo de trabajo era un alambre de platino, el electrodo auxiliar, un alambre de platino enrollado y el electrodo de referencia, un electrodo de calomel saturado (ECS). Todos los potenciales se informan vs. ECS. La concentración de las β -carbolinas usadas fue: *nor*-harmano, $5,95 \times 10^{-4}$ M; harmano, $5,05 \times 10^{-4}$ M y harmina, $4,71 \times 10^{-4}$ M. Los valores obtenidos se presentan en el Capítulo 3. Estas mediciones se realizaron en el laboratorio del Dr. J. Olabe Iparaguirre, INQUIMAE, FCEyN, UBA.

E.7 Irradiación de β -carbolinas aromáticas

E.7.1 Irradiación en escala preparativa en soluciones de ROH con CCl_4

E.7.1.1 Identificación de los productos principales

Se irradiaron con una lámpara de Hg de presión media (Hanau TQ 150), bajo atmósfera de aire, a temperatura ambiente, soluciones del alcaloide (10,0 mg / 100 ml de la mezcla EtOH- CCl_4 1:1 v.v)) (aproximadamente 10^{-4} M), hasta total desaparición de la materia prima (monitoreada por espectroscopía de absorción UV-vis.), obteniéndose en todos los casos una única mancha por ccd (placas de sílica gel; solventes de desarrollo: mezclas de éter de petróleo, benceno, AcOEt y EtOH; revelador: luz UV de $\lambda = 366$ nm y I_2). Luego de evaporado el solvente, al producto obtenido se le tomó el punto de fusión y se realizaron sus espectros de RMN. Al disolver en etanol el producto obtenido en cada caso se determinó la presencia de ion Cl^- por medio del ensayo de $\text{AgNO}_3/\text{HNO}_3$.

A continuación se describen los espectros de RMN de los alcaloides como bases libres y del producto principal de la irradiación, el cual fue identificado en todos los casos como el correspondiente clorhidrato.

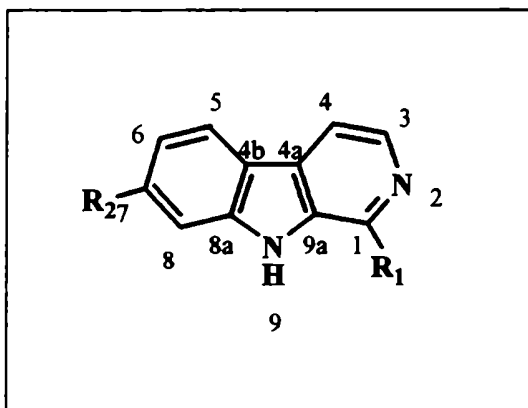


Figura 47 Numeración de los átomos de las β -carbolinas.

nor-Harmano:

Base libre: p.f. 198-199 °C (lit. 198-200 °C¹²⁴)

¹H (100 MHz, DMSO-d₆): δ 11,56 (s, H-9), 8,90 (s, H-1), 8,34 (d, *J* 6 Hz, H-3), 8,24 (d, *J* 8 Hz, H-5), 8,09 (d, *J* 6 Hz, H-4), 7,56 (m, H-7 y H-8) y 7,34-7,15 ppm (m, H-6),

Producto de la irradiación: clorhidrato (12,0 mg) p.f. 199-200 °C (lit. 232-235 °C¹²⁴)

¹H (100 MHz, DMSO-d₆): δ 12,71 (s, H-9), 9,29 (s, H-1), 8,79 (d, *J* 6 Hz, H-3), 8,59 (d, *J* 8 Hz, H-5), 8,52 (d, *J* 6 Hz, H-4), 7,82 (m, H-7 y H-8) y 7,58-7,36 ppm (m, H-6).

EM: m/z (%): 169 (82), 168 (100), 167 (60), 141 (64), 140 (92), 115 (19), 114 (71), 113(50), 88 (21), 84 (34), 71 (19), 63 (23).

Harmano:

Base libre: p.f. 235 °C (lit. 235-238 °C¹²⁴)

¹H (100 MHz, DMSO-d₆)⁷⁴: δ 11,60 (s, H-9), 8,27 (d, *J* 5 Hz, H-3), 8,22 (d, *J* 8 Hz, H-5), 7,93 (d, *J* 5 Hz, H-4), 7,65 (m, H-7 y H-8), 7,28 (m, H-6) y 2,86 ppm (s, Me).

¹³C (25 MHz, DMSO-d₆)¹²⁵: δ 142,1 (C-1), 140,6 (C-9a), 137,1 (C-3), 134,5 (C-8a), 127,6 (C-7), 126,8 (C-4b), 121,9 (C-5), 121,0 (C-4a), 119,9 (C-6), 112,3 (C-4), 111,7 (C-8) y 19,7 ppm (C-Me).

Producto de la irradiación: clorhidrato (11,8 mg) p.f. 210-212 °C (lit. 297 °C¹²⁴)

¹H (100 MHz, DMSO-d₆): δ 13,02 ppm (s, H-9), 8,69 (d, *J* 6 Hz, H-3), 8,56 (d, *J* 5 Hz, H-5), 8,51 (d, *J* 6 Hz, H-4), 7,85 (dd, *J* 6 Hz y 1 Hz, H-7 y H-8), 7,6-7,4 (m, H-6) y 3,12 ppm (s, Me).

¹³C (25 MHz, DMSO-d₆): δ 143,4 (C-9a), 138,9 (C-1), 134,1 (C-4b), 131,8 (C-8a), 131,4 (C-7), 128,6 (C-3), 123,6 (C-5), 121,4 (C-6), 120,0 (C-4a), 115,6 (C-4), 113,0 (C-8) y 16,4 ppm (C-Me).

Harmina:

Base libre: p.f. 260-262 °C (lit. 262-264 °C¹²⁴)

^1H (100 MHz, DMSO- d_6)⁷⁴: δ 11,35 (s, H-9), 8,17 (d, J 6 Hz, H-3), 8,05 (d, J 8 Hz, H-5), 7,79 (d, J 6 Hz, H-4), 7,05 (d, J 2 Hz, H-8), 6,88 (dd, J 8 Hz y 2 Hz, H-6), 3,89 (s, MeO) y 2,68 ppm (s, Me).

Producto de la irradiación: clorhidrato (11,5 mg) p.f. 250-252 °C (lit. 268-270 (desc.) °C¹²⁴)

^1H (100 MHz, DMSO- d_6): δ 13,00 (s, H-9), 8,51 (d, J 6 Hz, H-3), 8,39 (d, J 6 Hz, H-4), 8,38 (d, J 8 Hz, H-5), 7,19 (d, J 2 Hz, H-8), 7,08 (dd, J 8 Hz y 3 Hz, H-6), 3,99 (s, MeO) y 3,06 ppm (s, Me).

E.7.1.2 *Caracterización e identificación de subproductos por cg y cg-EM*

Soluciones de *nor*-harmano, harmano y harmina de concentración aproximadamente 10^{-3} M fueron irradiadas en tubos Pyrex con una lámpara de Hg presión media Hanau TQ 150 ($\lambda > 320$ nm) ubicándolos a 10 cm de la misma. Los solventes empleados fueron mezclas de EtOH- CCl_4 1:1 (v:v) e i-PrOH- CCl_4 1:1 (v:v), realizándose las irradiaciones tanto en atmósfera de aire como en atmósfera de N_2 a temperatura ambiente. En este último caso primero se hacía vacío en el recipiente conteniendo a la solución y luego se burbujeaba ésta con N_2 previamente pasado por Drierite.

Se monitoreó la reacción por espectroscopía de absorción UV-vis. diluyendo una cantidad apropiada de muestra en el solvente correspondiente (EtOH o i-PrOH). Alicuotas a tiempo 0, distintos grados de conversión y conversión total (según el espectro de absorción UV-vis) fueron analizadas también por cg utilizándose una columna Ultra-2 (5% difenil-95% dimetilpolisiloxano, largo: 25 m, diámetro interno: 0,20 mm), gas portador: He o N_2 y detector de ionización de llama (FID). Las condiciones convenientes para realizar la corrida cromatográfica resultaron ser: temperatura del inyector: 250°C; temperatura inicial: 100°C (2 minutos) gradiente: 10°C/min. hasta 280°C (25 minutos). Complementariamente, también

se analizaron las alícuotas iniciales y finales por cg-EM. Para ello se utilizó la misma columna Ultra-2 o bien una columna DB-5 (similar a la Ultra-2) con el siguiente programa: temperatura del inyector: 250°C; temperatura inicial: 100°C (2 minutos) gradiente: 20°C/min. hasta 250°C (20 minutos). EM: (EI) ionización a 70 eV.

Para analizar la presencia de productos más volátiles se utilizó una columna capilar CP SIL PONA (largo: 100 m, diámetro interno: 0,25 mm), gas portador: He o N₂, detector de ionización de llama (FID), con el siguiente programa: temperatura del inyector: 240°C; temperatura inicial: 40°C (0 minutos) gradiente: 10°C/min. hasta 250°C (9 minutos). EM: (EI) ionización a 70 eV. Para estas experiencias se utilizaron las soluciones obtenidas al irradiar al *nor*-harmano en las dos mezclas de solventes antes mencionadas.

Descripción de los resultados obtenidos por cg y cg-EM

Sistema I: i-PrOH-CCl₄ 1:1 (v:v)

cg:

Irradiado bajo atmósfera de N₂

***nor*-Harmeno, harmeno y harmina:** aparecen Señales a tiempo de retención (*t_r*): 5,40, 7,30, 8,10 y 9,70 min.

Irradiado bajo atmósfera abierta

Las mismas señales excepto la de 5,40 min. que no aparece.

cg-EM

Irradiado bajo atmósfera de N₂

***nor*-Harmeno y harmeno:**

Señal 168: (*t_r*: 4,80 min.) C₂Cl₆ m/z (%): 207 (4), 205 (22), 203 (65), 201 (100), 199 (C₂Cl₅ 60), 170 (4), 168 (18), 166 (36), 164 (27), 121 (23), 119 (70), 117 (68).

Señal 236: (*t_r*: 5,93 min.) m/z (%): 173 (4), 171 (29), 169(38), 131 (11), 129 (67), 127 (100), 105 (4), 103 (45), 61 (51), 43 (86).

Señal 264: (t_r : 6,38 min.) m/z (%): 173 (5), 171 (29), 169(38), 139 (33), 137 (100), 131 (11), 129 (63), 127 (99), 97 (29), 95 (90), 77 (13), 43 (88).

Señal 318: (t_r : 7,30 min.) m/z (%): 205 (8), 203 (9), 173 (23), 171 (27), 163 (17), 161 (15), 139 (16), 137 (64), 131 (11), 129 (20), 97 (22), 95 (73), 77 (11), 43 (100).

En el caso del ***nor*-harmano** también se detectó:

Señal 771 (t_r : 14,85 min.) carboisopropoxi-*nor*-harmano ($C_{15}H_{14}N_2O_2$) m/z (%): 254 (M^+ , 56), 212 (9), 195 (14), 168 (100), 140 (21), 113 (8), 43 (18).

Sistema II: EtOH- CCl_4 1:1 (v:v)

cg-EM

***nor*-Harmano:**

Irradiado bajo atmósfera de N_2

Señales con el núcleo β -carbolínico:

Señal 554: (t_r : 10,37 min.) *nor*-harmano ($C_{11}H_8N_2$) m/z (%): 168 (M^+ , 100), 140 (21), 114 (12), 84 (10), 71 (11).

Señal 614: (t_r : 11,17 min.) m/z (%): 429 (5), 355 (4), 322 (4), 283 (7), 263 (13), 243 (32), 212 (8), 197 (10), 167 (9), 149 (13), 135 (11), 121 (13) 109 (17), 95 (52), 81 (75), 67 (84), 55 (87), 41 (100).

Señal 623: (t_r : 11,29 min.) carboetoxi-*nor*-harmano ($C_{14}H_{12}N_2O_2$) m/z (%): 240 (M^+ , 66), 181 (60), 168 (100), 140 (34), 71 (42), 61 (40).

Señales provenientes del solvente:

Señal 393: (t_r : 8,22 min.) m/z (%): 199 (34), 184 (51), 171 (100), 156 (13), 143 (26), 128 (15), 115 (9), 91 (7), 84 (12).

Señal 507: (t_r : 9,75 min.) m/z (%): 256 (11), 227 (3), 213 (10), 199 (5), 185 (9), 171 (7), 149 (11), 143 (6), 129 (21), 115 (8), 97 (11), 83 (16), 73 (58), 60 (64), 43(100).

Señal 511: (t_r : 9,79 min.) m/z (%): 284 (5), 256 (5), 241 (5), 213 (8), 199 (5), 185 (7), 171 (5), 157 (16), 143 (6), 129 (11), 115 (8), 101 (44), 88 (84), 73 (39), 55 (57), 43(100).

Señal 578: (t_r : 10,69 min.) m/z (%): 308 (4), 262 (6), 220 (4), 178 (5), 164 (6), 150 (7), 135 (11), 123 (12), 109 (19), 95 (44), 81 (65), 67 (81), 55 (81), 41 (100).

Señal 588: (t_r : 10,82 min.) m/z (%): 312 (8), 284 (2), 269 (7), 255 (3), 241 (3), 227 (3), 213 (8), 199 (4), 185 (3), 171 (3), 157 (16), 143 (6), 129 (6), 115 (6), 101 (53), 88 (100), 70 (28), 55 (43), 43(83).

Señal 593: (t_r : 10,89 min.) m/z (%): 252 (2), 224 (2), 167 (1), 153 (2), 139 (4), 125 (9), 111 (17), 97 (32), 83 (35), 69 (31), 61 (35), 55 (49), 43(100).

Señal 665: (t_r : 11,85 min.) m/z (%): 280 (1), 252 (1), 167 (1), 153 (2), 139 (4), 125 (8), 111 (15), 97 (29), 83 (32), 69 (28), 61 (33), 55 (44), 43(100).

Irradiado bajo atmósfera abierta

Señales con el núcleo β -carbolínico:

Señal 407: (t_r : 10,20 min.) *nor*-harmano

Señal 411: (t_r : 10,25 min.) Cloro-*nor*-harmano ($C_{11}H_7N_2Cl$) m/z (%): 204 (6), 202 (M^{+} , 18), 168 (100), 140 (31), 114 (18), 84 (19), 71 (14).

Señal 446: (t_r : 11,10 min.) carboetoxi*nor*-harmano ($C_{14}H_{12}N_2O_2$) m/z (%): 240 (M^{+} , 46), 181 (44), 168 (100), 140 (26),

No hay señales provenientes del solvente.

Harmano:

Irradiado bajo atmósfera N_2

Señales con el núcleo β -carbolínico:

Señal 545: (t_r : 10,25 min.) harmano ($C_{12}H_{10}N_2$) m/z (%): 182 (M^{+} , 100), 154 (33), 127 (15), 91 (17), 77 (15), 63 (20).

Señal 555 (t_r : 10,37 min.) Cloro-harmano ($C_{12}H_9N_2Cl$) m/z (%): 218 (5,5), 216 (M^{+} , 16,5), 182 (100), 154 (26), 127 (10), 77 (16), 63 (10).

Señal 593: (t_r : 10,89 min.) 284 (1), 252 (1), 241 (1), 224 (1), 207 (1), 182 (45), 154 (11), 149 (5), 125 (7), 111 (12), 97 (24), 83 (27), 69 (27), 57 (59), 43 (100).

Señal 619: (t_r : 11,24 min.) carboetoxiharmano ($C_{15}H_{14}N_2O_2$) m/z (%): 254 (M^{+} , 91), 195 (100), 153 (18), 90 (42), 77 (65).

Señales provenientes del solvente:

Señal 392: (t_r : 8,21 min.) *idem* señal 393 del *nor*-harmano.

Señal 510: (t_r : 9,79 min.) *idem* señal 507 del *nor*-harmano.

Señal 510: (t_r : 10,69 min.) *idem* señal 578 del *nor*-harmano.

Señal 587: (t_r : 10,81 min.) *idem* señal 593 del *nor*-harmano.

Señal 664: (t_r : 11,84 min.) *idem* señal 665 del *nor*-harmano.

Irradiado bajo atmósfera abierta

Señales con el núcleo β -carbolínico:

Señal 388: (t_r : 9,97 min.) harmano ($C_{12}H_{10}N_2$) m/z (%): 182 (M^{+} , 100), 154 (21), 127 (8), 91 (9), 77 (5).

Señal 396: (t_r : 10,10 min.) Cloro-harmano ($C_{12}H_9N_2Cl$) m/z (%): 218 (10), 216 (M^{+} , 30), 182 (100), 154 (25), 127 (9), 77 (8).

Señal 420: (t_r : 10,50 min.) probable Cloro-harmano ($C_{12}H_9N_2Cl$) m/z (%): 216 (M^{+} , 2), 182 (100), 154 (28), 101 (20), 88 (39).

Señal 424: (t_r : 10,57 min.) probable Cloro-harmano ($C_{12}H_9N_2Cl$) m/z (%): 216 (M^{+} , 2), 182 (100), 154 (28), 127 (9), 97 (16), 83 (19).

No hay señales provenientes del solvente.

Harmina:

Irradiada bajo atmósfera de N_2

Señales con el núcleo β -carbolínico:

Señal 480: (t_r : 11,50 min.) Cloro-harmina ($C_{13}H_{11}N_2OCl$) m/z (%): 248 (33), 246 (M^{+} , 100), 231 (38), 203 (45), 168 (5).

Señales provenientes del solvente:

Señal 360: (t_r : 9,50 min.) *idem* señal 511 del *nor*-harmano.

Señal 419: (t_r : 10,48 min.) *idem* señal 588 del *nor*-harmano.

Señal 424: (t_r : 10,57 min.) *idem* señal 593 del *nor*-harmano.

Irradiada bajo atmósfera abierta

Señales con el núcleo β -carbolínico:

Señal 475: (t_r : 11,42 min.) Harmina ($C_{13}H_{12}N_2O$) m/z (%): 212 (M^+ , 100), 197 (20), 169 (39).

Señal 479: (t_r : 11,48 min.) Cloro-harmina ($C_{13}H_{11}N_2OCl$) m/z (%): 248 (34), 246 (M^+ , 100), 231 (36), 203 (56), 168 (19).

Señales provenientes del solvente:

Señal 360: (t_r : 9,50 min.) *idem* señal 511 del *nor*-harmano.

Señal 419: (t_r : 10,48 min.) *idem* señal 588 del *nor*-harmano.

Señal 424: (t_r : 10,57 min.) *idem* señal 593 del *nor*-harmano.

E.7.2 Irradiación en CHCl_3

Al irradiar soluciones clorofórmicas de *nor*-harmano, harmano y harmina (concentración aproximadamente 1×10^{-4} M) con una lámpara de Hg de baja presión Hanau TNN 1542 usando recipientes de cuarzo, ubicados a 20 cm de la misma, por espectroscopía de absorción UV-vis, se observó que se formaba la correspondiente forma protonada (clorhidrato).

E.7.2.1 Irradiación en presencia de atrapantes de radicales

Soluciones de *nor*-harmano ($1,19 \times 10^{-4}$ M) fueron también irradiadas, según la técnica descrita en E.7.2, en la presencia de: i) naftaleno (relación molar 10:1) y ii) ciclohexeno (relación molar 10:1). El progreso de la reacción fue seguido por espectroscopía de absorción UV-vis. con una solución testigo (sin agregado de atrapantes). En el caso de usarse naftaleno, el residuo sólido obtenido luego de evaporar el solvente a presión reducida fue analizado por espectroscopía de masa observándose Señales correspondientes a las estructuras de: Cloro-triclorometil-naftaleno ($\text{C}_{11}\text{H}_6\text{Cl}_4$, $\text{M}^{+\bullet}$ m/z 278), triclorometil-naftaleno ($\text{C}_{11}\text{H}_7\text{Cl}_3$, $\text{M}^{+\bullet}$ m/z 244), diclorometil-naftaleno ($\text{C}_{11}\text{H}_7\text{Cl}_2$, $\text{M}^{+\bullet}$ m/z 209), naftaleno (C_{10}H_8 , $\text{M}^{+\bullet}$ m/z 128) y *nor*-harmano ($\text{C}_{11}\text{H}_8\text{N}_2$, $\text{M}^{+\bullet}$ m/z 168).

E.7.3 Irradiación en CH_2Cl_2

Se realizó la irradiación del *nor*-harmano con una lámpara de Hg de presión media Hanau TQ 150 en soluciones de CH_2Cl_2 (6×10^{-3} M) contenidas en recipientes de Pyrex, ubicados a 15 cm de la misma, bajo atmósfera de aire. Aún luego de 24 hs de irradiación, no se observó ninguna nueva señal por ccd (sílica gel, solventes de desarrollo y reveladores

indicados en E.7.1.1). Para analizar la posibilidad de formación de productos no volátiles, se evaporó el solvente a presión reducida. Al sólido obtenido se lo disolvió en etanol, realizándose los espectros electrónicos de absorción UV-vis y de emisión y excitación fluorescentes, dando positivo el ensayo de iones Cl^- de $\text{AgNO}_3/\text{HNO}_3$. Éstos revelaron que el sólido era una mezcla del alcaloide original y de su clorhidrato. El análisis de los espectros de absorción UV-vis. y de RMN- ^1H indicó que se trataba mayoritariamente del compuesto de partida. Según el espectro de absorción el grado de conversión es del orden del 10%.

También se realizaron irradiaciones con la lámpara de Hg de presión baja Hanau TNN 1542 del *nor*-harmano (6×10^{-5} M) disueltos en mezclas de CH_2Cl_2 -EtOH 10:1 (v:v), 1:1 (v:v) y 1:10 (v:v) utilizando recipientes de cuarzo ubicados a 20 cm de la lámpara, en atmósfera de aire, a temperatura ambiente. En todos los casos el producto obtenido luego de 4 horas de irradiación resultó ser la forma protonada del *nor*-harmano (clorhidrato) (conversión > 95%), según lo indicado por los espectro de absorción UV-vis correspondientes.

E.8 Síntesis térmica de clorhidratos de β -carbolinas

Se sintetizaron muestras auténticas de clorhidratos de β -carbolinas para ser utilizadas como sustancias testigos, burbujeando HCl (generado a partir de H_2SO_4 concentrado A.R. y NaCl sólido A.R.) en soluciones de la β -carbolina en AcOEt, $(\text{Et})_2\text{O}$ y/o CH_2Cl_2 . De esta manera se obtenía un precipitado blanco caseoso, que luego de separado por filtración a través de un embudo de vidrio sinterizado y de secado era caracterizado convenientemente (p.f., Rf, RMN, espectroscopía electrónica). Los espectros de RMN- ^1H obtenidos se muestran en las Figuras 38 a 40. Los p.f. resultaron similares a los que se indican en la sección E.7.1.1.

EM: m/z (%): 169 (82), 168 (100), 167 (60), 141 (65), 140 (92), 115 (19), 114 (71), 113(50), 88 (20), 84 (33), 70 (19), 63 (22).

E.9 Síntesis de cloro derivados de β -carbolinas²³

Una mezcla de la β -carbolina ($1,37 \times 10^{-4}$ moles) y del N-cloro benzotriazol (NCB) en relación molar 1:1 usando como solvente CHCl_3 se mantuvo a 60°C durante 1 hora. El agregado de agente clorante disuelto en el mismo solvente se realizó gota a gota durante los primeros 15 minutos. Se tomaron alícuotas a distintos tiempos de reacción con el objeto de verificar el avance de la misma por ccd (sílica gel, solvente de desarrollo: éter de petróleo:AcOEt 5:1, revelador: luz UV a 366 nm, iodo). Los productos obtenidos se caracterizaron por cg-EM usando condiciones similares a las descriptas para el sistema II de la sección E.7.1.2.

nor-Harmano:

Señal 204: (t_r : 6,90 min.) Benzotriazol ($\text{C}_6\text{H}_5\text{N}_3$) m/z (%): 119 (M^{+} , 54), 91 (69), 64 (100), 52 (50).

Señal 405: (t_r : 10,25 min.) Cloro-*nor*-harmano ($\text{C}_{11}\text{H}_7\text{N}_2\text{Cl}$) m/z (%): 204 (31,6), 202 (M^{+} , 100), 168 (20), 140 (17)

Señal 466: (t_r : 11,27 min.) Cloro-*nor*-harmano ($\text{C}_{11}\text{H}_7\text{N}_2\text{Cl}$) m/z (%): 204 (33,6), 202 (M^{+} , 100), 167 (15), 140 (15),

Harmano

Señal 313: (t_r : 7,16 min.) Benzotriazol ($\text{C}_6\text{H}_5\text{N}_3$) m/z (%): 119 (M^{+} , 54), 91 (69), 64 (100), 52 (50).

Señal 530: (t_r : 10,05 min.) Harmano ($\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{N}_2$) m/z (%): 182 (M^{+} , 100), 154 (33), 127 (15), 91 (17), 77 (15), 63 (20).

Señal 540: (t_r : 10,27 min.) Cloro-harmano ($C_{12}H_9N_2Cl$) m/z (%): 218 (18), 216 (M^{+} , 61), 182 (100), 154 (41), 127 (18), 77 (37), 63 (35).

Señal 648: (t_r : 11,63 min.) Cloro-harmano ($C_{12}H_9N_2Cl$) m/z (%): 218 (31), 216 (M^{+} , 100), 181 (26), 154 (20), 127 (11), 77 (22), 63 (18).

Las posibles estructuras de los productos obtenidos teniendo en cuenta la densidad de carga de los átomos y le mecanismo de la reacción, se discuten en el Capítulo 4.

E.10 Generación térmica de radicales $\cdot CCl_3$ ¹²⁶:

Se procedió a la generación de los radicales $\cdot CCl_3$ por vía térmica en soluciones que contenían a sus posibles atrapantes. En ampollas cerradas bajo atmósfera de N_2 , se mantuvieron a 80°C durante 16 hs soluciones etanólicas (3 ml) de peróxido de benzoilo (1 mg) a las que se agregaron:

10 mg de naftaleno: *solución 1*

10 mg de naftaleno + 100 μ l de CCl_4 : *solución 2*

10 mg de nor-harmano: *solución 3*

10 mg de nor-harmano + 100 μ l de CCl_4 : *solución 4a*

10 mg de nor-harmano + 100 μ l de CCl_4 : *solución 4b*

La reacción se finalizaba por calentamiento a 110°C durante 1 hora. En todos los casos el monitoreo de la reacción se realizó por cg-EM, en un equipo Hewlett Packard GC HP5890 interfaseado a un detector EM Hewlett Packard HP5970B usando una columna de fenilmetilsilicona 5%, (25 m x 0,32 mm de diámetro interno), siendo las condiciones en las que se obtuvieron los cromatogramas: temperatura del inyector: 250°C; programa (i) temperatura inicial: 90°C (1 minuto) gradiente: 10°C/min. hasta 280°C (20 minutos); (ii) temperatura inicial: 200°C (1 minuto) gradiente: 10°C/min. hasta 300°C (20 minutos); EM: ionización a 70 eV.

Solución 1: t_r 5,40 min.: naftaleno ($C_{10}H_8$, M^{++} m/z 128).

Solución 2: t_r 1,00 min.: tetracloroetileno (CCl_2CCl_2 , M^{++} m/z 164); t_r 4,00 min.: benceno (C_6H_6 , M^{++} m/z 78); t_r 5,40 min.: ($C_{10}H_8$, M^{++} m/z 128); t_r 16,60 min.: ditriclorometilo-naftaleno ($C_{12}H_8Cl_6$), m/z (%): 366 (4), 364 (4), 362 (M^{++} , 2), 249 (7), 247 (20), 245 (20), 213 (10), 211 (70), 209 (86), 128 (100); t_r 17,60 min.: cloro-triclorometilo-naftaleno ($C_{11}H_8Cl_4$) m/z (%): 282 (3), 280 (M^{++} , 12), 247 (16), 245 (18), 213 (9), 211 (50), 209 (62), 175 (45), 128 (100).

Solución 3: t_r 4,90 min.: ácido benzoico ($C_7H_6O_2$, M^{++} m/z 122); t_r 14,95 min.: *nor*-harmano ($C_{11}H_8N_2$) m/z (%): 168 (M^{++} , 100), 140 (62), 114 (30); t_r 15,35 min.: (PhCOCOPh, M^{++} m/z 210).

Solución 4a y 4b: t_r 4,90 min.: ácido benzoico ($C_7H_6O_2$, M^{++} m/z 122); t_r 15,00 min.: *nor*-harmano ($C_{11}H_8N_2$) m/z (%): 168 (M^{++} , 100), 140 (62), 114 (30); t_r 15,45 min.: (PhCOCOPh, M^{++} m/z 210); t_r 15,70 min.: carboetoxi-*nor*-harmano ($C_{14}H_{12}N_2O_2$) m/z (%): 240 (M^{++} , 14), 195 (18), 168 (100), 140 (14).

Los resultados obtenidos se discuten en el Capítulo 4.

E.11 Medición de eficiencias cuánticas de formación de iones cloruros

Con el objeto de evaluar la concentración de iones cloruro formados en el medio de reacción se utilizaron diferentes técnicas.

Primero se intentó dosar la cantidad de iones cloruro formados usando el método de Mohr (titulación con $AgNO_3$, en medio neutro, con K_2CrO_4 como indicador de punto final), previa extracción desde la solución orgánica con agua neutralizada con $NaHCO_3$. Este método no dio resultado ya que, aun en las condiciones usadas para irradiar en escala preparativa (concentración de β -carbolinas: 5×10^{-4} M), la cantidad de iones cloruro formada

resultó ser menor que la que es posible detectar con esta técnica volumétrica (límite de detección 1×10^{-3} M en Cl^-)¹²⁷.

Después utilizó el método colorimétrico con Hg^{++} -difenilcarbazida (DFC). El método se basa en la formación del complejo $\text{HgCl}_4^{=}$ a partir del desplazamiento del Hg^{++} del complejo que éste forma con la DFC. Este último es de color violeta y lo que se observa es una disminución de la absorbancia a 525 nm. En este caso también debíamos hacer una extracción previa con agua de la solución irradiada, ya que la determinación del Cl^- se realiza en este medio. Este método si bien teóricamente presenta parámetros de mérito adecuados para la cuantificación de los Cl^- formados (límite de detección 10^{-4} M)¹²⁸, no nos permitió obtener resultados reproducibles a la vez que observamos pendientes distintas para la curva de calibración toda vez que se efectuaba el dosaje.

También se intentó la cuantificación por cromatografía iónica, usando un cromatógrafo HPLC (columna aniónica 302IC467; solvente de elución: solución de EDTA 2×10^{-3} M a pH= 5,60; flujo: 1,5 ml/min.; detector: UV a 220 nm). En este caso el problema experimental se debió a la interferencia que ejercía la β -carbolina. La solución orgánica irradiada debía ser extraída con agua. Como la cromatografía de iones permite trabajar con volúmenes pequeños, el factor de dilución aplicado a la solución en análisis resultó mucho menor, a lo que se sumó que esta técnica es más sensible que las anteriores. No obstante ello, aun luego de neutralizar el medio de reacción, la poca cantidad de β -carbolina que se solubilizaba en la fase acuosa, generaba una señal que interfería con la de los cloruros. Por lo tanto tampoco se pudieron obtener resultados concluyentes. Estas experiencias se realizaron en el Laboratorio de la Comisión Nacional de Energía Atómica con la asistencia de la Lic. Raquel Gettar y del Lic. R. Crubellati.

Finalmente se determinó la cantidad de iones cloruro formados usando un electrodo específico de cloruro (Cole Parmer 27502-13; ámbito de linealidad: 10^{-5} a 10^{-1} M)¹²⁹ así como también se dosaron los protones del medio utilizando el correspondiente electrodo para H^+ (electrodo de pH de vidrio Cole Parmer 5992-10, ámbito de trabajo: 1 a 12

unidades de pH) ambos operados con el correspondiente medidor de iones Cole Parmer Chemcadet-meter Series 5986. El monitoreo de la reacción se efectuó tomando alícuotas de la solución irradiada (concentración de β -carbolina: $4,7$ a $6,0 \times 10^{-3}$ M) y llevándolas a volumen con H_2O en matraces de $10,00$ ml. Así se determinó la cantidad de iones Cl^- y H^+ en solución, mostrándose los resultados obtenidos en el Capítulo 4.

Con estos datos se calculó entonces la eficiencia cuántica de formación de iones cloruro en relación a la eficiencia cuántica de formación de producto (β -carbolinas protonada), determinada por espectroscopía de absorción UV-vis.

E.12.1 *Medición de los rendimientos cuánticos de formación de producto y desaparición de reactivo*

Se determinaron los rendimientos cuánticos de desaparición de reactivo Φ_B y formación de productos Φ_P utilizando como actinómetro el ferrioxalato de potasio ($K_3Fe(C_2O_4)_3$)^{105,130}.

Como actinómetro se utilizó una solución 6×10^{-3} M de $K_3Fe(C_2O_4)_3$ en H_2SO_4 $0,1$ N. La sal fue sintetizada para tal fin, según la técnica descrita por Parker¹⁰⁵. Se mezclaron 60 ml de $K_2C_2O_4$ $1,5$ M con 20 ml de $FeCl_3$ $1,5$ M, agitando el sistema durante 5 minutos bajo condiciones de iluminación controlada (cuarto iluminado por una luz roja). Luego de dejar reposar la solución y raspar con una varilla las paredes del recipiente apareció un precipitado verde. Este precipitado fue recristalizado de agua dos veces y finalmente secado en corriente de aire a 45 °C, obteniéndose según literatura, el $K_3Fe(C_2O_4)_3 \cdot 3H_2O$.

Este actinómetro se basa en la reducción del Fe^{+3} a Fe^{+2} por acción de la luz. El Fe^{+2} formado es dosado midiendo la absorbancia a 510 nm del complejo que forma con α -fenantrolina en el medio de reacción. En nuestras experiencias se tomaba 1 ml de la solución de $K_3Fe(C_2O_4)_3$ 6×10^{-3} M irradiada, se le agregaba $0,5$ ml de un buffer de $H_2SO_4/NaAcO$

(preparado a partir de 600 ml de NaAcO 1 N y 360 ml de H₂SO₄ 1 N diluidos a 1000 ml) y 2 ml de solución de *o*-fenantrolina 0,05%, llevando todo a volumen final: 10,0 ml. Se dejaba la solución en la oscuridad durante 20 minutos y se medía la absorbancia a 510 nm. Paralelamente se hacía un blanco con solución de K₃Fe(C₂O₄)₃ sin irradiar. Haciendo uso de una curva de calibración previamente obtenida se determinaba la concentración de Fe⁺².

La curva de calibración era obtenida a partir de los valores de absorbancia medidos a 510 nm en soluciones con distinta concentración de Fe⁺² preparadas con 2 ml de solución de *o*-fenantrolina 0,05% y 5 ml del buffer de H₂SO₄/NaAcO mantenidas en la oscuridad durante 20 minutos. Las soluciones con concentración conocida de Fe⁺² se prepararon a partir de una solución fresca 0,1 M de (NH₄)₂FeSO₄.

Se eligió como sistema modelo para la medición de Φ_B con este actinómetro una solución de harmano (10⁻⁵ M) en la mezcla EtOH-CCl₄ 1:1 (v:v). Se colocaba un volumen de esta solución en una cubeta de cuarzo y en otras dos cubetas volúmenes iguales de la solución del K₃Fe(C₂O₄)₃. El rendimiento cuántico de la formación de Fe⁺² a partir de esta sal (Φ_s) es conocido¹⁰⁴. Una de las cubetas con K₃Fe(C₂O₄)₃ se ponía detrás de la cubeta con β -carbolina y la otra al lado de la cubeta de β -carbolina de forma tal de recibir la misma irradiación que ésta. De la primera cubeta con K₃Fe(C₂O₄)₃ se medía la formación de Fe⁺² ([Fe⁺²]₁), de la segunda cubeta con K₃Fe(C₂O₄)₃ también se medía la formación de Fe⁺² ([Fe⁺²]₀).

Entonces el
$$\Phi = \Delta[\beta\text{-carbolina}] / I_a$$

donde $\Delta[\beta\text{-carbolina}]$ es la variación en la concentración de β -carbolina seguida por espectroscopia de absorción UV-vis e I_a es la intensidad de luz absorbida expresada en Einsteins min.⁻¹.

$I_a = I_0 - I_t$, donde I_0 es la intensidad de la lámpara e I_t es la intensidad transmitida por la solución. I_0 e I_t se obtienen de $I_0 = [\text{Fe}^{+2}]_0 / \Phi_s$ y $I_t = [\text{Fe}^{+2}]_t / \Phi_s$

Los valores obtenidos se detallan en el Capítulo 4.

También se midió el rendimiento cuántico de formación de la β -carbolina protonada por la descomposición del CCl_4 fotosensibilizada por la misma β -carbolina protonada. Para ello se eligió el sistema harmano en EtOH-CCl_4 1:1 (v:v). Al irradiar esta solución con la lámpara de Hg de presión media Hanau TQ 150, usando un filtro de interferencia de 367 nm y uno de corte de 385 nm durante 60 minutos no se observaba reacción fotoquímica. Esta misma solución se la irradiaba sin los filtros hasta una conversión de β -carbolina de aproximadamente un 20%. Entonces se volvía a irradiar la solución con el arreglo de filtros indicado, condiciones éstas en las cuales sólo absorbe la β -carbolina protonada, y se monitoreaba la producción de más β -carbolina protonada (absorción UV-vis.). Usando el ferrioxalato de potasio como actinómetro en forma análoga a como se lo usó con al irradiar la β -carbolina neutra se determinó el rendimiento cuántico de formación de producto. Los valores obtenidos se muestran y discuten en el Capítulo 4.

Para medir los rendimientos cuánticos Φ_B de los otros sistemas estudiados se utilizó como actinómetro de referencia (Ref) el harmano en EtOH-CCl_4 1:1 (v:v), ajustando la concentración de la solución en estudio de tal forma que la intensidad absorbida por ambas soluciones fuera la misma. Para lograr esto, como no se contaba con una fuente de luz monocromática, se trató de que las áreas de absorción irradiadas fueran las mismas, y se supuso que la irradiancia de la lámpara en ese rango de longitudes de onda fuera constante. Esta suposición parece razonable ya que la lámpara que se utilizó es una de Hg de presión media Hanau TQ 150, siendo su espectro de emisión casi un continuo en el rango utilizado: 330 a 360 nm. Se integró cada espectro en el rango de 330 a 360 nm multiplicado la Absorbancia de la muestra por el % de transmitancia del filtro de corte a cada longitud de onda tomando los espectros en forma digitalizada y utilizando el programa Excel 4.0. De esta manera se pudieron igualar las áreas de absorción.

Considerando un decaimiento radiativo de primer orden desde el reactivo y la referencia, tenemos que:

$$\Phi_X = k_X [X]_0 \Phi_{ref} / k_{ref} [Ref]_0 \quad [51]$$

Los resultados obtenidos se encuentran en el Capítulo 4

E.12.2 Medición de las constantes de velocidad k en distintos solventes

Para efectuar la irradiación de las β -carbolinas en los distintos solventes se utilizó una lámpara de Hg de presión media (Hanau Quartzlampen GmbH TQ 150), ubicando las muestras a 2,5 cm de la misma, usando un filtro de corte de 360 nm (Schott, WG360, espesor: 2,0 mm). El recipiente usado fue una cubeta de cuarzo Hellma de 1 cm de paso óptico, con tapa, manteniéndose la solución con constante agitación mecánica. Las determinaciones se efectuaron en atmósfera de aire, a 25,0 °C, usando un crióstato Lauda RC 6.

A intervalos de tiempo convenientes se registraron espectros de absorción UV-vis, técnica con la cual se monitoreaba la reacción.

Se utilizaron soluciones de i) harmano (5×10^{-5} M) en mezclas RH-CCl₄ 1:1 (v:v), siendo RH: MeOH, EtOH, n-PrOH, dioxano, éter etílico, MeCN y CH₂Cl₂; ii) *nor*-harmano (5×10^{-5} M) en mezclas RH-CCl₄ 1:1 (v:v), siendo RH: MeOH, EtOH, dioxano y CH₂Cl₂; y iii) harmina (5×10^{-5} M) en mezclas EtOH-CCl₄ 1:1 (v:v).

Con esta metodología también se realizaron experiencias con soluciones de *nor*-harmano y de harmano de concentración 5×10^{-5} M en EtOH y en MeCN, a las que se agregaba concentraciones variables de CCl₄ (de 0,04 a 1 M).

Así también se realizaron experiencias similares en mezclas de ciclohexano-CCl₄ 1:1 (v:v) con agregados de ROH (0,085 a 0,750 M), bajo atmósfera de N₂, seleccionándose al

ciclohexano como solvente, ya que se comporta como un medio inerte para la reacción estudiada.

El conjunto de resultados obtenidos se presentan y discuten en el Capítulo 4.

E.12.3 Medición de las constantes de velocidad k en presencia de atrapantes de radicales

Utilizando la misma metodología a la descrita en E.12.1 (usar como referencia la irradiación del harmano en la mezcla EtOH-CCl₄ 1:1 (v:v) en atmósfera de aire), se realizaron irradiaciones en presencia de dos atrapantes de radicales diferentes: ciclohexeno y galvinoxil.

Cuando se utilizó ciclohexeno se irradiaron tres sistemas distintos: uno con la solución de referencia, el segundo con la solución de harmano más ciclohexeno en relación molar 10:1 respecto del harmano y el tercero con la solución de harmano más ciclohexeno en relación molar 100:1 respecto del harmano.

En las experiencias con galvinoxil se realizaron irradiaciones utilizando siete sistemas diferentes:

- 1) solución de referencia (ver detalles en E.12.1)
- 2) solución de galvinoxil (3×10^{-4} M) en EtOH-CCl₄ 1:1 (v:v), en atmósfera de aire
- 3) solución de galvinoxil (3×10^{-4} M) en EtOH-CCl₄ 1:1 (v:v), en atmósfera de aire, monitoreando particularmente la zona entre 500 y 800 nm.
- 4) solución de harmano en presencia de galvinoxil (3×10^{-4} M), en atmósfera de aire
- 5) solución de harmano en presencia de galvinoxil (3×10^{-4} M), en atmósfera de nitrógeno
- 6) solución de harmano en presencia de galvinoxil (3×10^{-5} M), en atmósfera de aire
- 7) solución de harmano en presencia de galvinoxil (3×10^{-5} M), en atmósfera de nitrógeno.

Los resultados obtenidos en cada caso se describen en el Capítulo 4.

E.13 Descripción del Specfit-Factor Analysis FA131,132

Los espectros de absorción UV-vis pueden describirse teniendo en cuenta la concentración c de cada componente y la absorción molar ε de cada uno de ellos a cada longitud de onda.

$$a(\lambda) = \sum_{i=1}^r c_i \varepsilon_i(\lambda)$$

r es el número de componentes, c_i la concentración de cada componente i , ε_i es el valor de la absorción molar para el espectro normalizado a concentración unitaria.

Entonces una serie de j espectros se puede describir como $a_j(\lambda) = \sum_{i=1}^r c_{ij} \varepsilon_i(\lambda)$, $j = 1$ a n ,

donde $a_j(\lambda)$ es el espectro de la muestra j , c_{ij} es la concentración de el componente i en la muestra j , n es el número de muestras.

Es equivalente escribirlo como una matriz $A = CV$, donde A es una matriz $n \times m$ que contiene los n espectros de m puntos, como filas; C es una matriz $n \times r$ conteniendo los perfiles de la concentración de cada uno de los componentes como columnas y V es una matriz $r \times m$ conteniendo los espectros normalizados (en $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$) como filas.

La matriz A se obtiene experimentalmente. Los vectores de las filas dependen de los agregados de titulante, si el experimento realizado es una titulación. El problema es ahora encontrar las matrices C y V .

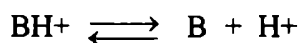
La descomposición de la matriz A en el producto de dos matrices no es única. Existen dos algoritmos usualmente usados: NIPALS y SVD. Ambos son equivalentes para el tratamiento que sigue. Encontradas entonces dos matrices T y P tales que $A = TP$.

se puede reescribir: $A = T \times R^{-1} \times R \times P$

donde R es una matriz de $n \times n$, siendo entonces $C = T \times R^{-1}$ y $V = R \times P$

El procedimiento para calcular **R** implica la aplicación de un modelo químico definido para la evolución de los perfiles de concentración en función de pH, tiempo, concentración de titulante, etc. dependiendo del experimento.

Por ejemplo, para una titulación seguida espectrofotométricamente,



los perfiles de concentración están dados por

$$[\text{B}] = K_a [\text{B}]_o / ([\text{H}^+] (1 + K_a))$$

$$[\text{BH}^+] = [\text{B}]_o (1 - K_a / ([\text{H}^+] (1 + K_a)))$$

donde $[\text{B}]_o = [\text{B}] + [\text{BH}^+]$ y $K_a = [\text{B}] [\text{H}^+] / [\text{BH}^+]$

En este caso, conocido $[\text{B}]_o$ y asumiendo un valor aproximado para K_a , se puede estimar un valor para la matriz **C** (cuyos vectores describen la evolución con el pH de la concentración de los componentes). Ésta está relacionada con la matriz **T** según $\mathbf{C} = \mathbf{T} \times \mathbf{R}^{-1}$ entonces la matriz **R** debe satisfacer

$$\mathbf{R}^{-1} = [(\mathbf{T}^t \times \mathbf{T})^{-1} \times \mathbf{T}^t] \times \mathbf{C}$$

El valor de K_a que mejor satisfaga esta relación deberá hacer a la matriz diferencia **D** mínima

$$\mathbf{D} = [\text{C}_{i,j} - (\mathbf{T} \times \mathbf{R}^{-1})_{i,j}]^2$$

Para encontrar el valor de K_a se hace una optimización iterativa de manera de encontrar el valor mínimo de **D**. En este caso usamos el gradiente de optimización conjugado como está implementado en la herramienta Solver del programa Excel 4.0.

Este método ha sido utilizado en el Capítulo 1, para el estudio del equilibrio β -carbolina-ROH y en el Capítulo 3 para el estudio del sistema β -carbolina-CBr₄.

E.14 Modelado molecular

Haciendo uso de métodos semiempíricos de la mecánica cuántica que vienen incluidos en el paquete de programas reunidos bajo la denominación Hyper Chem Computational Chemistry⁴⁵, se efectuó la optimización de la geometría de las moléculas. Para ello se utilizó el método PM3 (basado en NDO: neglect of diatomic differential overlap). Usando las distintas variables que ofrece este método se pudieron optimizar tanto moléculas neutras, como cationes, aniones, zwitteriones, cationes radicales y radicales, eligiendo según el caso la variante UHF o RHF, según que en el sistema quedaran o no electrones desapareados.

Si bien al realizar las optimizaciones geométricas no es posible tener en cuenta la real interacción con el medio, las geometrías obtenidas dan una buena aproximación de la imagen real de las moléculas.

Una vez obtenida la geometría óptima, haciendo uso del método de cálculo denominado "Single Point", se pudieron determinar, entre otras, propiedades moleculares tales como variación de la entalpía de formación (ΔH_f), momento dipolar, densidad electrónica total, carga neta atómica y volumen molecular. Los valores de estas propiedades, los cuales fueron utilizados entre otras cosas para calcular λ_i en el Capítulo 3, se presentan en la Tabla 40

Tabla 40 Algunas propiedades calculadas por el método semiempírico PM3

β -Carbolinas	Especie	ΔH_f (kcal/mol)	HOMO (eV)	LUMO (eV)	V (Å ³)
nor-Harmano	neutro	61,10	-8,694	-0,585	532,22
	cación	208,48	-12,343	-5,414	540,39
	cación radical	247,43	-10,460	-4,701	533,45
	cación radical(a)	254,56	-10,891	-4,904	
	anión	28,61	-3,550	3,740	523,76

	radical	101,09	-5,595	-0,602	526,19
	zwitterión	85,92			532,43
Harmano	neutro	52,20	-8,607	-0,557	583,17
	cación	197,26	-12,250	-5,340	589,64
	cación radical	236,16	-10,280	-4,642	584,78
	cación radical(a)	243,45	-10,750	-4,804	
	anión	157,56	-3,525	3,720	577,51
	radical	91,84	-5,498	-0,562	579,18
	zwitterión	75,74			584,33
Harmina	neutro	13,89	-8,640	-0,502	660,04
	cación	157,56	-12,111	-5,242	667,50
	cación radical	198,02	-10,242	-4,559	661,29
	cación radical(a)	205,08	-10,690	-4,680	
	anión	18,83	-3,614	3,665	654,68
	radical	53,86			655,90
	zwitterión	37,05			661,11
Harmol	neutro	6,82	-8,679	-0,533	604,31
	cación	151,17			611,70
	cación radical	192,12			604,96
	cación radical(a)	199,18	-10,767	-4,745	
	anión				
	radical	46,80			599,95
	zwitterión O-	33,94			603,42
	zwitterión N-	29,87			604,36
Harmalina	neutro	7,42	-8,317	-0,417	676,26
	cación	151,12			682,89
	cación radical	184,80	-9,804	-4,821	677,40
	cación radical(a)	191,25	-10,300	-4,832	
	anión	-24,13	-3,570	3,762	670,41
	radical	43,55	-5,334	-0,430	672,61
	zwitterión	30,93			677,85

Harmalol	neutro	8,40	-8,345	-0,456	620,69
	cation	144,76	-11,967	-5,435	627,25
	cation radical	178,92	-9,888	-4,915	621,28
	cation radical(a)	199,17	-10,385	-4,929	
	anion	-32,50	-3,256	3,171	612,41
	radical	37,91	-5,366	-0,492	617,58
	zwitterion O-	18,51			619,10
	zwitterion N-	23,94			621,99

(a) Cálculo "Single Point" realizado para el cation radical con geometría de especie neutra.

Carga neta sobre los átomos

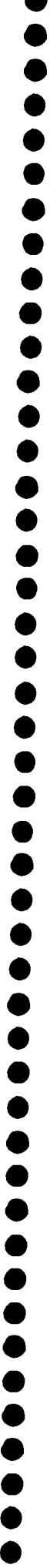
Una vez obtenidas las geometrías óptimas para los distintos compuestos, se procedió a evaluar el valor de la carga neta asociada a cada átomo. El método semiempírico de cálculo utilizado para evaluar dichas cargas es el método PM3, el cual es considerado en la actualidad como el más adecuado para cálculos de estructuras moleculares en las que estén presentes heteroátomos.

Tabla 41 Carga neta asociada a cada átomo (a)

β -Carbolina	Especie	C-1	N-2	C-3	C-4	C-5	C-6	C-7	C-8	N-9
nor-Harmano	neutro	-0,061	-0,065	-0,089	-0,096	-0,041	-0,127	-0,074	-0,108	0,213
	cation	-0,232	0,583	-0,267	0,010	-0,017	-0,094	-0,022	-0,097	0,333
	c, r, (b)	0,057	-0,044	0,029	-0,064	-0,010	-0,013	-0,082	0,004	0,681
	zwitterion	-0,282	0,600	-0,413	0,016	-0,049	-0,140	-0,091	-0,088	-0,164

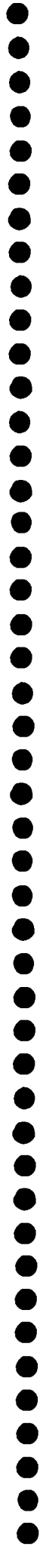
Harmano	neutro	-0,034	-0,064	-0,083	-0,105	-0,041	-0,127	-0,074	-0,109	0,211
	cación	-0,175	0,556	-0,259	0,004	-0,017	-0,095	-0,023	-0,099	0,327
	c, r,(b)	0,094	-0,053	0,033	-0,064	-0,016	-0,017	-0,080	-0,003	0,673
	zwitterión	-0,229	0,578	-0,406	0,016	-0,050	-0,140	-0,093	-0,088	-0,167
Harmina	neutro	-0,031	-0,068	-0,079	-0,111	-0,006	-0,166	-0,120	-0,198	0,210
	cación	-0,158	0,528	-0,239	-0,017	0,019	-0,140	0,184	-0,217	0,307
	c, r,(b)	0,101	-0,059	0,035	-0,064	-0,005	-0,047	0,105	-0,110	0,665
	zwitterión	-0,229	0,566	-0,391	0,003	-0,017	-0,171	0,104	-0,183	-0,180
Harmol	neutro	-0,030	-0,068	-0,078	-0,112	-0,002	-0,169	0,131	-0,213	0,209
	cación	-0,159	0,531	-0,239	-0,016	0,024	-0,142	0,194	-0,229	0,307
	c, r,(b)	0,101	-0,056	0,037	-0,063	-0,000	-0,049	0,114	-0,117	0,667
	-0,360(c) zwit, O(d)	-0,152	0,267	-0,153	-0,148	0,004	-0,224	0,356	-0,270	0,163
	-0,232(c) zwit, N(e)	0,043	0,074	-0,083	-0,030	-0,029	-0,131	0,112	-0,205	-0,103
Harmalina	neutro	0,014	-0,120	-0,046	-0,041	-0,013	-0,159	0,113	-0,198	0,297
	cación	0,057	0,315	-0,123	-0,053	-0,020	-0,106	0,002	-0,130	0,391
	c, r,(b)	-0,069	0,030	-0,078	-0,080	0,036	-0,129	0,175	-0,120	0,453
	zwitterión	0,042	0,073	-0,083	-0,029	-0,033	-0,129	0,099	-0,189	-0,101
Harmalol	neutro	0,014	-0,120	-0,047	-0,042	-0,009	-0,161	0,125	-0,214	0,294
	cación	0,088	0,280	-0,112	-0,056	0,015	-0,139	0,212	-0,266	0,365
	c, r,(b)	-0,070	0,033	-0,078	-0,080	0,038	-0,128	0,182	-0,130	0,541
	-0,336(c) zwit, O(d)	-0,076	0,054	-0,086	-0,045	-0,021	-0,193	0,350	-0,257	0,154
	-0,235(c) zwit, N(e)	-0,232	0,560	-0,391	0,002	-0,012	-0,174	0,115	-0,199	-0,182

(a) numeración: ver Figura 47; (b) catión radical; (c) carga asociada al oxígeno; (d) zwitterión: N-2 protonado, O desprotonado; (e) zwitterión: N-2 protonado, N-9 desprotonado.



RESUMEN





El objetivo del presente trabajo de Tesis es el estudio del comportamiento fotoquímico de las β -carbolinas aromáticas: *nor*-harmano, harmano, harmina y harmol y de dos β -carbolinas parcialmente hidrogenadas (3,4-dihidrogenadas): harmalina y harmalol en solución, en solventes orgánicos, en presencia de halometanos y 1,2-dibromoetano.

Para iniciar el estudio del comportamiento fotoquímico de las β -carbolinas en medios orgánicos se estudiaron primero sus espectros electrónicos, debido a que había en la literatura muy poca información sobre este tipo de espectros para estos alcaloides en medios orgánicos. En este trabajo por primera vez se han descrito y comparado entre sí los espectros electrónicos de absorción UV-vis, excitación y emisión fluorescentes del *nor*-harmano, harmano, harmina y harmol en una serie de solventes orgánicos y en medios rígidos (sílica gel, papel, muestra en polvo) así como los de la harmalina y el harmalol a 298 y 77 K.

De estos espectros surge que las β -carbolinas totalmente aromáticas en solventes orgánicos presentan bandas debidas a la absorción de su forma neutra en la región UV, hasta aproximadamente 360 nm. Estos espectros UV-vis. son sensibles al agregado de ácido, formándose la especie protonada, catiónica, la cual absorbe a longitudes de onda mayores que la correspondiente especie neutra. Esto implica que es posible irradiar y monitorear selectivamente la formación del catión en presencia de la especie neutra. Por su parte las β -carbolinas 3,4-dihidrogenadas son aún más sensibles a la presencia de ácidos, observándose según el solvente usado tanto la señal de la especie neutra como la de la protonada y/o zwitteriónica.

Los espectros de excitación resultaron similares a los de absorción en el caso de las β -carbolinas totalmente aromáticas, no siendo así en el caso de las 3,4-dihidrogenadas. Esto nos permitió postular que en estos alcaloides el Φ_f de la especie neutra es mucho menor que el de la especie catiónica, ya que no pudimos detectar la fluorescencia de la forma neutra aunque sí la del catión.

Para todas las β -carbolinas aromáticas estudiadas tanto la especie neutra como la catiónica presentan una eficiencia cuántica de fluorescencia alta. La especie neutra no es posible visualizarla aisladamente por fluorescencia en soluciones acuosas pero sí en solventes orgánicos. Por lo tanto se determinaron los rendimientos cuánticos de fluorescencia de esta especie obteniéndose valores que oscilaron entre 0,11 y 0,45. A partir de éstos y de los valores de tiempo de vida de fluorescencia intrínseco τ_0 se calcularon en forma teórica algunos tiempos de vida medios de fluorescencia τ .

Estos alcaloides siguen presentado fluorescencia medible aun en soportes de uso poco frecuente como son la sílica gel, el papel o directamente la muestra en polvo. En estos casos no se observó un comportamiento uniforme aunque en general se detectaron las señales correspondientes al catión o al zwitterión aun en el caso de las β -carbolinas totalmente aromáticas. En matrices rígidas a bajas temperaturas (77 K) estos compuestos presentaron el comportamiento habitual que acompaña a este tipo de cambio de estado de agregación: mayor resolución de las señales, un leve corrimiento batocrómico en el espectro de excitación y uno de tipo hipsocrómico en el de emisión respecto de los espectros realizados a temperatura ambiente.

Tanto por espectroscopia de absorción UV-vis. como por emisión fluorescente se logra caracterizar la formación de un complejo entre la β -carbolina y el ROH del tipo 1:2 (molécula : molécula) en solventes no polares no próticos tales como el ciclohexano y el isopentano. En estos medios se pudo determinar tanto por métodos clásicos (ecuación de Foster³⁹) como por métodos más modernos (análisis factorial¹³¹) la constante de formación de estos complejos.

Las frecuencias de los máximos de absorción de las β -carbolinas aromáticas presentan en orden creciente valores parecidos entre sí en los diferentes alcoholes, luego valores mayores en acetonitrilo, éter etílico, dioxano, solventes halogenados y finalmente valores máximos en ciclohexano. Si comparamos esos valores con los valores de los parámetros que

describen las propiedades físico químicas de los solventes utilizados, la tendencia observada es la misma que la que se observa en los valores de β (capacidad aceptora de hidrógeno en un puente de hidrógeno⁵²) y DN (*donor number* de Gutmann⁵³). Ambos parámetros reflejan la capacidad donora de un par de electrones, por lo tanto puede concluirse que sería éste el factor que más influye en la estabilización del estado fundamental del alcaloide en solución, ya que las β -carbolinas en estas condiciones pueden tanto compartir su par de electrones del nitrógeno piridínico como su hidrógeno del nitrógeno pirrólico.

Como señalamos antes los espectros electrónicos de estos alcaloides indican que éstos son especialmente sensibles a la presencia de ácidos en el medio. Por ello se determinó mediante estos métodos espectroscópicos dadas las especiales características de la absorción y la emisión de las β -carbolinas e indicadores utilizados, las constantes de acidez del equilibrio β -carbolina neutra- β -carbolina protonada, tanto en el estado electrónico fundamental como en el primer estado electrónico excitado singulete, usando como solvente acetonitrilo. Como en el caso de los espectros electrónicos, la única información que se encontraba en la literatura estaba relacionada con la medición de las constantes de acidez de estos alcaloides en medio acuoso, siendo por primera vez éstas determinadas en un solvente orgánico, como es el acetonitrilo. Los valores de pKa obtenidos en acetonitrilo resultaron mayores que los obtenidos en agua en aproximadamente 7 unidades de pH. Esto indica que las β -carbolinas son más básicas en este medio orgánico, comportamiento predecible teniendo en cuenta la capacidad de solvatación del solvente. Además, las β -carbolinas 3,4-dihidrogenadas resultaron más básicas que las aromáticas. Esto se explica teniendo en cuenta la mayor localización de la carga del par electrónico n del anillo piridínico en las primeras debido a la pérdida del carácter aromático.

En este trabajo de Tesis también se usó por primera vez el ciclo de Förster para determinar la diferencia entre los valores de pKa correspondientes a los estados electrónicos fundamental y excitado singulete en diversos solventes orgánicos. Los valores obtenidos

indican que las β -carbolinas en medios orgánicos también son más básicas en el estado electrónico excitado.

Mediante una titulación fluorométrica se pudo determinar que al menos en acetonitrilo el equilibrio ácido-base predicho por el ciclo de Förster no llega a establecerse durante el tiempo de vida de la especie fluorescente.

El equilibrio ácido-base que involucra al H del grupo hidroxilo del harmol y del harmalol ha sido estudiado en forma cualitativa. En principio la β -carbolina parcialmente hidrogenada sería más ácida que la totalmente aromática, resultado que se explica también considerando la ya mencionada capacidad de deslocalizar una carga del compuesto totalmente aromático respecto del análogo parcialmente hidrogenado. Cabe señalar que muchas veces tanto en química térmica como en fotoquímica no se tiene en cuenta el tratamiento usado para purificación y secado del solvente. Como se discute en el presente trabajo, este hecho puede dar origen a diferencias fácilmente detectables en los espectros electrónicos de las β -carbolinas, las que si bien resultan importantes en general, ya que modifican las propiedades electrónicas de los sustratos, son particularmente graves en el caso de usar esta técnica como método de cuantificación. Dadas estas propiedades, especialmente el harmalol y la harmalina podrían usarse como sensores simples de la presencia de pequeñas cantidades de agua, ácidos y bases en solventes orgánicos.

También se ha estudiado la posible interacción entre las β -carbolinas y compuestos halogenados alifáticos de baja masa molecular. No se han encontrado evidencias de que se forme un complejo de transferencia de carga entre las β -carbolinas y los compuestos halogenados usados, encontrándose ambos en el estado electrónico fundamental.

Por el contrario cuando las β -carbolinas se encuentran electrónicamente excitadas sí forman exciplotes con estos compuestos halogenados, los cuales, como se determinó experimentalmente, actúan como quenchers de la fluorescencia de aquéllas. Este quenching es de tipo dinámico y podría ocurrir a través de un proceso de transferencia electrónica de la

β -carbolina excitada al compuesto halogenado. Como se muestra en el Capítulo 3 se realizaron los cálculos de la variación de energía libre asociada a dichos procesos (ΔG^0_{te}), los cuales predicen que éstos son termodinámicamente factibles. Al interpretar los resultados obtenidos con los modelos de Marcus y Rehm-Weller se pudieron obtener los datos de potencial de oxidación de las β -carbolinas en los distintos solventes utilizados así como el valor de la barrera intrínseca de la reacción $\Delta G^\ddagger(0)$. A su vez con estos valores se obtuvieron las energías asociadas al proceso de reorganización de solvente (λ), el que acompaña al proceso de transferencia de electrones. Los valores de λ obtenidos a partir de los datos experimentales se compararon con aquéllos obtenidos a partir de cálculos teóricos, siendo ambos similares.

Cuando se utilizaron altas concentraciones de CHCl_3 y CCl_4 el proceso de quenching de la fluorescencia no estaría limitado por barreras térmicas sino más bien por barreras entrópicas y/o estéricas, modificando éstos además las propiedades del medio en donde se realiza la medición considerablemente.

Además las β -carbolinas aromáticas en solución, en las mezclas $\text{RH}:\text{CCl}_4$, reaccionan por acción de la radiación UV para dar el correspondiente clorhidrato con más de un 98 % de rendimiento. El mismo producto se forma al irradiarlas en soluciones de CHCl_3 o CH_2Cl_2 sin necesidad de agregar un donador de hidrógeno (RH).

La interacción entre la β -carbolina electrónicamente excitada con la molécula de CCl_4 sería el primer paso de la reacción. Como consecuencia de ésta se forma el radical $\cdot\text{CCl}_3$ evidenciado por la formación tanto de CHCl_3 como de C_2Cl_6 . Esta primera interacción podría ocurrir a través de una transferencia de energía o una transferencia de electrón. En este momento no tenemos evidencias definitivas a favor de alguno de los dos procesos, si bien como se discute en el Capítulo 4, el segundo de los procesos sería el más probable. De ocurrir una transferencia de electrón, proceso termodinámicamente factible, se formaría el catión radical de la β -carbolina, el cual reaccionaría con el solvente abstrayendo un

hidrógeno para dar como producto principal el catión, es decir la forma protonada de la β -carbolina. En el caso de la transferencia de energía se formaría el radical $\cdot\text{Cl}$ el cual abstraería un H del medio para formar primero el HCl y reaccionar luego con la β -carbolina formando el clorhidrato correspondiente. Los estudios fotofísicos realizados (Capítulo 3), la falta de sensibilidad de la reacción a atrapantes de radicales como el ciclohexeno y el naftaleno y el tipo de resultados obtenidos con el galvinoxil favorecerían la hipótesis de la transferencia del electrón a partir de la β -carbolina neutra electrónicamente excitada.

La ausencia de oxígeno no influye en la naturaleza de los productos sino simplemente en la eficiencia con que éstos se forman, pudiendo explicarse este efecto simplemente como un quenching físico.

La naturaleza del cosolvente tampoco influye en la naturaleza del producto principal aunque sí en la velocidad del proceso, lo que puede explicarse combinando propiedades tales como la capacidad para formar puentes de hidrógeno y la capacidad de generar radicales por pérdida de hidrógeno.

Entre los subproductos se encontraron trazas de carboalcoxi ésteres y β -carbolinas monocloradas. Los primeros provendrían de la interacción de la β -carbolina con los reactivos acilantes ($\text{CCl}_3\text{OO}\cdot$ y/o fosgeno, formados por reacción del radical $\cdot\text{CCl}_3$ con el oxígeno) y el alcohol. Los derivados clorados a su vez provendrían de la interacción del catión radical de la β -carbolina con el ion Cl^- dentro de la caja de solvente o bien de la interacción de la β -carbolina neutra en su estado fundamental con el radical $\cdot\text{Cl}$, formado a partir de la descomposición del fosgeno y/o del radical $\cdot\text{CCl}_3$. El último sería el mecanismo de reacción más probable ya que se observó un aumento en el rendimiento y cantidad de productos clorados cuando la irradiación se realizó en presencia de oxígeno. Simultáneamente estos resultados están de acuerdo con una muy baja reactividad del catión radical de la β -carbolina con el anión Cl^- en contacto ambos dentro de la caja de solvente. Cabe señalar que estos productos se detectaron en cantidad de trazas, siendo muy dificultosa su caracterización e identificación.

BIBLIOGRAFÍA



1. V. Deulofeu, *Ciencia y Cultura*, **25**, 649 (1973).
2. N.R. Farnsworth, *Science*, **162**, 1086 (1968).
3. D.G. Harvey, E.J. Miller y W. Robson, *J. Chem. Soc.*, 153 (1941).
4. P. Rocca, F. Marsais, A. Godard y G. Queguiner, *Tetrahedron*, **49**, 49 (1993).
5. S.G. Hadley, A.S. Muraki y K. Spitzer, *J. Forensic Sci.*, **19**, 657 (1974).
6. O.S. Wolfbeis, E. Fuerlinger y R. Wintersteiger, *Monatsh. Chem.*, **113**, 509 (1982).
7. O.S. Wolfbeis y E. Fuerlinger, *Z. Phys. Chem. N.F.*, **129**, 171 (1982).
8. R. Sakurovs y K.P. Ghiggino, *J. Photochem.*, **18**, 1 (1982).
9. K.P. Ghiggino, P.F. Skilton y P.J. Thistlethwaite, *J. Photochem.*, **31**, 113 (1985).
10. F. Tomas Vert, I. Zabala Sanchez y A. Olba Torrent, *J. Photochem.*, **23**, 355 (1983).
11. F. Tomas Vert, I. Zabala Sanchez y A. Olba Torrent, *J. Photochem.*, **26**, 285 (1984).
12. J. Romero Berto, I. Zabala Sanchez, J.M. Aulló Reverte, F. Tomas Vert y A. Olba Torrent, *J. Photochem.*, **29**, 405 (1985).
13. F. Tomas, I. Zabala y A. Olba, *J. Photochem.*, **31**, 253 (1985).
14. A. Olba Torrent, F. Tomas Vert, I. Zabala Sanchez y P. Medina Casamayor, *J. Photochem.*, **37**, 109 (1987).
15. M. Krishnamurthy y S. K. Dogra, *Photochem. Photobiol.*, **44**, 571 (1986).
16. M. Krishnamurthy y S.K. Dogra, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 1247 (1986).
17. A.Pardo, D. Reyman, J.M.L. Poyato y F. Medina, *J. Lumin.*, **51**, 269 (1992).
18. A. Dias, A.P. Varela, M. da G. Miguel, A.L. Macanita y R.S. Becker, *J. Phys. Chem.*, **96**, 10290 (1992).
19. J.M. Aulló y F. Tomás Vert, *An. Quím.*, **75**, 11 (1979).
20. A. Olba, P. Medina, A. Codoñer y S. Monsó, *J. Photochem.*, **39**, 273 (1987).
21. H.H. Jaffé y M. Orchin, *Theory and Applications of Ultraviolet Spectroscopy*, John Wiley and Sons, Inc. New York, 1964.
22. J.B. Birks, *Photophysics of Aromatic Molecules*, John Wiley & Sons Ltd., London, 1970.

23. Sergio M. Bonesi, Tesis Doctoral, FCEyN, UBA, 1995
24. M. A. El-Sayed, *J. Chem. Phys.*, **38**, 2834 (1963)
25. S.G. Schulman y A.C. Capomacchia, *J. Am. Chem. Soc.*, **95**, 2763 (1973)
26. N. Mataga, Y. Kaifu y M. Koizumi, *J. Chem. Soc. Japan*, **29**, 373 (1956)
27. C.A. Parker, *Photoluminescence of Solutions*, Elsevier Publishing Company, Amsterdam, 1968.
28. J.R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Academic Press, London, 1970.
29. J. Hidalgo, E. Roldan, D. Gonzalez-Arjona, M. Sanchez, A.Pardo y J.M.L. Poyato, *J. Photochem. Photobiol., A: Chem.*, **41**, 103 (1987).
30. A.Pardo, D. Reyman, E. Martin, J.M.L. Poyato, J.J. Camacho, J. Hidalgo y M. Sanchez, *J. Lumin.*, **42**, 163 (1988).
31. M. Balon, J. Hidalgo, P. Guardado, M.A. Muñoz y C. Carmona, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*, 99 (1993).
32. S. Roychowdhury y P. Roychowdhury, *Acta Cryst. Sect. A*, **37**, C205 (1981)
33. K. El-Sayed, D.M. Barnhart, H.L. Ammon y G.M. Wassel, *Acta Cryst.*, **C42**, 1383 (1986)
34. P.R. Maulik y B.S. Basak, *Acta Cryst. Sect. A*, **34**, S120 (1978)
35. E. Vander Donckt, *Prog.React. Kinet.*, **5**, 274 (1970)
36. N. Mataga, Y. Kaifu y M. Koizumi, *J. Chem. Soc. Japan*, **29**, 465 (1956)
37. R. Cattana, J. Perez, J.J. Silber y J.D. Anunziata, *Spectrochim. Acta*, **47A**, 821 (1991).
38. L.S. Frankel, C.H. Langford y T.R. Stengle, *J. Phys. Chem.*, **74**, 1376 (1970).
39. R. Foster, D. Ll. Hammick y A.A. Wardley, *J. Chem. Soc.*, 3817 (1953).
40. K.C. Ingham y M.A. El-Bayoumi, *J. Am. Chem. Soc.*, **96**, 1674 (1974).
41. S.T. Collins, *J. Phys. Chem.*, **87**, 3202 (1983).
42. H. A. Benesi y J.H. Hildebrand, *J. Am. Chem. Soc.*, **71**, 2703 (1949).
43. R.L. Scott, *Recl. Trav. Chim. Pays Bas Belg.*, **75**, 787 (1956).

44. J. Waluk, S. J. Komurovski y J. Herbich, *J. Phys. Chem.*, **90**, 3868 (1986).
45. HyperChem-Release 4.5. Hypercube, Inc., Canada, 1995.
46. P.T. Chou, C.Y. Wei, C.P. Chang y C.H. Chiu, *J. Am. Chem. Soc.*, **117**, 7259 (1995).
47. K.C. Ingham, M. Abu-Elgheit y M.A. El-Bayoumi, *J. Am. Chem. Soc.*, **93**, 5023 (1971).
48. J. Waluk, A. Grabowska, B. Pakula y J. Sepiol, *J. Phys. Chem.*, **88**, 1160 (1984).
49. S.J. Strickler y R.A. Berg, *J. Chem. Phys.*, **37**, 814 (1962).
50. S. Draxler y M.E. Lippitsch, *J. Phys. Chem.*, **97**, 11493 (1993).
51. J.B. Birks y D.J. Dyson, *Proc. R. Soc (London)*, **A275**, 135 (1963).
52. M.J. Kamlet, J.L.M. Abboud, M.H. Abraham y R.W. Taft, *J. Org. Chem.*, **48**, 2877 (1983).
53. Y Marcus, *Chem. Soc. Rev.*, 409 (1993).
54. M.A. Muñoz, M. Balón, M.C. Carmona, J. Hidalgo y M. Lopez Poveda, *Heterocycles*, **27**, 2067 (1988).
55. M.A. Muñoz Pérez, C. Carmona Guzmán, J. Hidalgo Toledo y M. Balón Almeida, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*, 1573 (1986).
56. M. Balón Almeida, M.A. Muñoz Pérez, M.C. Carmona Guzmán y J. Hidalgo Toledo, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*, 1165 (1988).
57. M. Balon, M.A. Muñoz, J. Hidalgo, M.C. Carmona y M. Sanchez, *J. Photochem.*, **36**, 193 (1987).
58. J. Hidalgo, M.C. Carmona, M. Balón y M.A. Muñoz, *Pharm. Weekbl. [Sci]*, **12**, 142 (1990).
59. M. Balon, J. Hidalgo, P. Guardado, M.A. Muñoz and C. Carmona, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*, 91 (1993).
60. M.C. Biondic y R. Erra-Balsells, *J. Chem Soc., Perkin Trans. 2*, 1049 (1992).
61. M. C. Biondic y R. Erra-Balsells, *J. Chem Soc., Perkin Trans. 2*, 887 (1993).

62. C. Reichardt, *Solvent Effects in Organic Chemistry*, Verlag Chemie, Weinheim-New York, 1979.
63. CRC *Handbook of Chemistry and Physics*, D.R. Lide, Ed. in Chief, CRC Press Inc., Boca Raton, Florida, 1995.
64. J.F. Coetzee y G.R. Padmanabhan, *J. Am. Chem. Soc.*, **87**, 5005 (1965)
65. W.S. Matthews, J.E. Bares, J.E. Bartmess, F.G. Bordwell, F.J. Cornforth, G.E. Drucker, Z. Margolin, R.J. McCallum, G.J. McCallum y N.R. Vanier, *J. Am. Chem. Soc.*, **97**, 7006 (1975)
66. I.M. Kolthoff, M.K. Chantooni y S. Bhowmik, *Anal. Chem.*, **39**, 315 (1967)
67. H. Maskill, *The Physical Basis of Organic Chemistry*, Oxford University Press, New York, 1985
68. I.M. Kolthoff, S. Bruckenstein y M.K. Chantooni, *J. Am. Chem. Soc.*, **83**, 3927 (1961)
69. J.F. Coetzee y G.R. Padmanabhan, *J. Phys. Chem.*, **66**, 1708 (1962).
70. M. Kasha, *Disc. Faraday Soc.*, **9**, 14 (1950).
71. J.F. Ireland y P.A.H. Wyatt, *Adv. Phys. Org. Chem.*, **12**, 132 (1976).
72. S.L. Murov, *Handbook of Photochemistry*, Marcel Dekker, Inc., New York, 1973.
73. N.J. Turro, *Modern Molecular Photochemistry*, The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc., Menlo Park, California, 1978.
74. R. Erra Balsells y A.R. Frasca, *Tetrahedron*, **39**, 33 (1983).
75. M.C. Biondic y R. Erra Balsells, *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.*, **77**, 179 (1994).
76. M.C. Biondic y R. Erra Balsells, *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.*, **51**, 341 (1990).
77. E.M. Kosower, *Prog. Phys. Org. Chem.*, **3**, 81 (1965).
78. R.F. Collins, *Chem. and Ind. (London)*, 704 (1957).
79. D.P. Stevenson y G.M. Coppinger, *J. Am. Chem. Soc.*, **84**, 149 (1962).
80. K.M.C. Davis y M.F. Farmer, *J. Chem. Soc. B*, 28 (1967).
81. R. Erra Balsells y A.R. Frasca, *Aust. J. Chem.*, **41**, 103 (1988).
82. R. Erra Balsells y A.R. Frasca, *Anal. Asoc. Quim. Argent.*, **76**, 285 (1988).

83. J.E. Frey, A. M. Andrews, S.D. Combs, S.P. Edens, J.J. Pucket, R.E. Seagle y L.A. Torreano, *J. Org. Chem.*, **57**, 6460 (1992).
84. R.E. Merrifield y W.D. Phillips, *J. Am. Chem. Soc.*, **80**, 2778 (1958).
85. W.B. Person, *J. Am. Chem. Soc.*, **87**, 167 (1965).
86. J. Klein, V. Pinaud-Plazanet y G. Laustriat, *J. Chim. Phys. Physicochim. Biol.*, **67**, 302 (1970).
87. D. Saperstein y E. Levin, *J. Chem. Phys.*, **62**, 3560 (1975).
88. M.V. Encinas, M.A. Rubio y E.A. Lissi, *J. Photochem.*, **18**, 137 (1982).
89. D. Rehm y A. Weller, *Isr. J. Chem.*, **8**, 259 (1970).
90. G.J. Kavarnos y N.J. Turro, *Chem. Rev.*, **86**, 401 (1986).
91. I. Kolthoff y J. Lingane, *Polarography*, c. XXXVIII, p.647, vol II, 2nd Edition, Interscience Publisher, New York, 1952.
92. K. Kikuchi, *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.*, **65**, 149 (1992).
93. Rehm y A. Weller, *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.*, **73**, 834 (1969).
94. R.A. Marcus, *J. Chem. Phys.*, **24**, 966 (1956).
95. E.S. Lewis, C.C. Shen y R.A. More O'Ferrall, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*, 1084 (1981).
96. R.A. Marcus, *J. Phys. Chem.*, **72**, 891 (1968).
97. N. Agmon y R.D. Levine, *Chem. Phys. Lett.*, **52**, 197 (1977).
98. F. Scandola, V. Balzani y G.B. Schuster, *J. Am. Chem. Soc.*, **103**, 2519 (1981).
99. P. Pruszyński, Y. Chiang, A.J. Kresge, N.P. Schepp y P.A. Walsh, *J. Phys. Chem.*, **90**, 3760 (1986).
100. I.A. Gould, D. Ege, S.L. Mattes y S. Farid, *J. Am. Chem. Soc.*, **109**, 3794 (1987).
101. L. Eberson, *Adv. Phys. Org. Chem.*, **18**, 79 (1982).
102. S. Fukuzumi, M. Fujita, J. Otera y Y. Fujita, *J. Am. Chem. Soc.*, **114**, 10271 (1992).
103. R.O. Loufty y A.C. Somersall, *Can. J. Chem.*, **54**, 760 (1976).
104. J. March, *Advanced Organic Chemistry*, Wiley, New York, 1992.

105. C.G. Hatchard y C.A. Parker, *Proc. Roy. Soc. (London)*, **A235**, 518 (1956).
106. S. Yu. Egorov, M.A. Babizhaev, A.A. Krasnovsky y A.A. Shvedova, *Biofizika (U.S.S.R.)*, **32**, 169 (1987).
107. M. R. Berenbaum y R.A. Larson, *Experientia*, **44**, 1030 (1988).
108. R. Li y E.C. Lim, *J. Chem. Phys.*, **57**, 605 (1972).
109. P.D. Bartlett y T. Funahashi, *J. Am. Chem. Soc.*, **84**, 2596 (1962).
- 109b. M.A. Fox y M. Chanon, Ed., *Photoinduced Electron Transfer*, Part A, Elsevier Science Publisher B.V., Amsterdam, 1988.
110. S. Murov y G. S. Hammond, *J. Phys. Chem.*, **72**, 3797 (1968).
111. G. Schlicht y D. Schulte-Frohlinde, *Photochem. Photobiol.*, **16**, 183 (1972).
112. T. Gannon y W. G. McGimpsey, *J. Org. Chem.*, **58**, 5639 (1993).
113. H. Paul, R.D. Small y J.C. Scaiano, *J. Am. Chem. Soc.*, **100**, 4520 (1978).
114. S.A. Markarian y H. Fischer, *J. Chem. Soc. Chem. Comm.*, 1055 (1979).
115. A. Anne, P. Hapiot, J. Moiroux, P. Neta y J-M. Saveant, *J. Phys. Chem.*, **95**, 2370 (1991).
116. C.P. Andrieux, A. Le Gorande y J-M. Saveant, *J. Am. Chem. Soc.*, **114**, 6892 (1992).
117. L. Eberson, *Acta Chem. Scand. B*, **36**, 533 (1982).
118. N.J. Bunce, K.U. Ingold, J.P. Landers, J. Lusztyk y J.C. Scaiano, *J. Am. Chem. Soc.*, **107**, 5464 (1985).
119. D.D. Perrin y W.L.F. Amarego, *Purification of Laboratory Chemicals*, 3rd Edition, Pergamon Press, New York, 1988.
120. A.I. Vogel, *Practical Organic Chemistry*, 3rd Edition, Longman Greens Co., London, 1964.
121. C.W. Pifer, E.G. Wollish y M. Schmall, *J. Am. Pharm. Assoc.*, **42**, 509 (1953).
122. S.E. Braslavsky y H.J. Kuhn, *Provisional List of Actinometers*, IUPAC edn., IUPAC, Mülheim am der Ruhr, 1987.
123. R. Rusakowicz y A.C. Testa, *J. Phys. Chem.*, **72**, 2680 (1968).

124. *Catalog Handbook of Fine Chemicals*, Aldrich, Milwaukee, 1995.
125. R. Erra-Balsells, *Magn. Reson. Chem.*, **26**, 1109 (1988).
126. Gerardo D. Castro, Tesis Doctoral, FCEyN, UBA, 1990.
127. I.M. Kolthoff, E.B. Sandell, E.J. Mehan y S. Bruckenstein, *Análisis Químico Cuantitativo*, 5 edición, Ed. Nigar S.R.L., Buenos Aires, 1972
128. D.F. Boltz, Ed., *Colorimetric Determination of Non-Metals*, Vol VIII, Interscience Publishers, Inc., New York, 1958.
129. Operating Instructions, Cole-Parmer 27502-12,-13 Chloride Electrodes, Niles, Illinois, USA, 1993.
130. A.D. Kirk y C. Namasivayam, *Anal. Chem.*, **55**, 2428 (1983).
131. H. Gampp, M. Maeder, C.J. Meyer y A.D. Zuberbühler, *Talanta*, **32**, 95 (1985); E.R. Malinowski, *Anal. Chem.*, **49**, 606 (1977).
132. A.R. Parise, S. Pollack, L.D. Slep y J.A. Olabe, *Anal. Asoc. Quím. Arg.*, **83**, 211 (1995).



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

**PHOTOCHEMISTRY OF β -CARBOLINES IN DILUTED
ORGANIC SOLUTIONS**

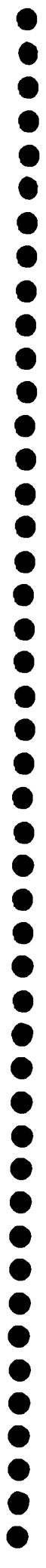
Miriana Carla Biondic

Lugar de Trabajo: **Departamento de Química Orgánica**

Directora de Tesis: **Dra. Rosa Erra-Balsells**

Tesis presentada para optar al título de
Doctor de la Universidad de Buenos Aires

1996



ABSTRACT

In this work the photochemical behavior of full aromatic β -carbolines (*nor*-harmane, harmane, harmine and harmol) and two 3,4-dihydro β -carbolines (harmaline and harmalol) was studied.

For the first time the UV absorption, emission and excitation spectra in organic solutions were described as well as on solid supports (silica gel, paper) and on powdered sample.

The K of the complexation equilibrium between the full aromatic β -carbolines with alcohols forming a 1:2 adducts were measured and the pK_a and pK_a^* in acetonitrile were determined by means of electronic absorption and fluorescence spectroscopy.

Considering that these compounds are markedly fluorescent their behavior in the presence of CCl_4 and other halomethanes (CH_2Cl_2 , $CHCl_3$, CH_2BrCH_2Br , $CHBr_3$ and CBr_4) which act as quenchers using either EtOH, iso-PrOH or MeCN as solvents was studied. We concluded that this quenching is dynamic and may take place through the formation of an exciplex followed by an electron transfer from the excited β -carboline to the halogenated compound starting the photochemical reaction. When a solution of either of these alkaloids (10^{-3} M) was irradiated in the presence of CCl_4 in a protic organic solvent, the main product obtained, with more than 98% yield, was the hydrochloride. Besides, the gc-MS analysis showed traces of carboalcoxy and chloro-derivatives.

The feasibility of an exciton or a photon single electron transfer mechanism is discussed and parameters such as ΔG_{te}^0 , K_{sv} , k_q , ΔG^\ddagger , $\Delta G^\ddagger(0)$, λ , and $E_{ox}^0(D)$ were calculated using the Rehm-Weller, Marcus and Stern-Volmer models. The quantum yield of photobleaching in different solvents was determined relative to the disappearance of harmane in EtOH- CCl_4 , which in turn was determined using potassium ferrioxalate as actinometer.

M.C. Bondie

file

KEY WORDS: β -carbolines, β -carbolines-photochemistry, β -carbolines-carbon-tetrachloride, β -carbolines-acid-base equilibrium, β -carbolines-electronic spectra

PALABRAS CLAVE: β -carbólinas, fotoquímica de β -carbólinas, β -carbólinas-tetracloruro de carbono, equilibrio ácido-base de β -carbólinas, espectros electrónicos de β -carbólinas

